



Facultad de Medicina  
Departamento de Cirugía

IMPLICACIONES DE LOS GENES REPARADORES  
*hMLH1* Y *hMSH2* EN EL CARCINOMA DE CÉLULAS  
RENALES ESPORÁDICO

TESIS DOCTORAL

ANTONIO RUBIO DEL CAMPO

MADRID, 2008

DIRECTORES:

PROF. DR. DAMIÁN GARCÍA OLMO

PROF. DR. ANTONIO SANTIAGO SALINAS SÁNCHEZ

PROF. DR. FRANCISCO SÁNCHEZ SÁNCHEZ



Facultad de Medicina  
Departamento de Cirugía

Don **DAMIÁN GARCÍA OLMO**, Profesor Doctor Titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Don **ANTONIO SANTIAGO SALINAS SÁNCHEZ**, Jefe de Sección de Urología del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete y Profesor Doctor Asociado de Urología del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Castilla La Mancha

Don **FRANCISCO SÁNCHEZ SÁNCHEZ**, Profesor Contratado Doctor del Área de Genética de la Facultad de Medicina de la de la Universidad de Castilla La Mancha

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**IMPLICACIONES DE LOS GENES REPARADORES hMLH1 Y hMSH2 EN EL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES ESPORÁDICO**” ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por Don Antonio Rubio del Campo. Una vez redactada la presente Memoria, ha sido revisada por los que suscriben, encontrándola apta para ser presentada y defendida ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste a los efectos oportunos firman el presente certificado en Madrid, a 10 de julio de dos mil ocho.

Profesores: Dr. Damián García Olmo. Dr. Antonio S. Salinas Sánchez Dr. Francisco Sánchez Sánchez



AVDA. DEL ARZOBISPO MORCILLO, S/N. 28029 MADRID TELÉFONO 3975300 EXT 5494

---

Este trabajo esta dedicado a mi Familia:  
A mis padres Paco y Concha, a mi  
hermano José Francisco, a mis abuelas  
Tomasita y Constanza, a mis tías, primos,  
y a Sandra.

---

## AGRADECIMIENTOS

Para todos aquellos que estáis empezando a leer la presente tesis, este apartado supone el inicio de lo que espero sea una lectura amena. Para mí significa el fin de un trabajo de varios años que no hubiera podido realizar sin la ayuda de muchas personas y de las cuales quisiera dejar recuerdo. No me resulta fácil hacer un listado de todas ellas, sobre todo porque la lista es extensa y uno corre el riesgo de olvidar a alguien que debería estar incluido. Gracias a todos, este trabajo os pertenece.

A mis directores de tesis, los profesores Dr. Antonio Salinas, Dr. Francisco Sánchez y Dr. Damián García, por haberme dado la oportunidad de iniciarme en las labores de investigación, por vuestros consejos y guía.

A la directora de la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, la Dra. M<sup>a</sup> Dolores García, espero que siga apoyando la investigación como hasta ahora, y pronto disfrute de la nueva Unidad de Investigación.

Al profesor Dr. Julio Escribano, por su paciencia y apoyo. Por haber puesto a mi disposición sus conocimientos y su laboratorio durante todo el tiempo que requirió el desarrollo experimental de esta tesis.

A los componentes de la sección de urología del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, especialmente a José Miguel y M<sup>a</sup> José.

A Trinidad Flores, que desde la secretaría de docencia hasta la de contabilidad siempre nos ayudó a todos los becarios en las agitadas aguas de la burocracia.

Al personal de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital Universitario La Fe de Valencia, especialmente a la Dra Magdalena Beneyto, jefa del servicio, por permitirme la estancia en su laboratorio, al Dr. Francisco Martínez, y a Silvestre Oltra, por haberme enseñado técnicas sin las cuales no habría podido completar esta tesis.

De igual forma quisiera agradecer a los compañeros de bancada su amistad y compañía, por las largas horas que hemos compartido en el laboratorio:

A los compañeros de la Unidad de Investigación del Hospital: M<sup>a</sup> Jesús, José Manuel, María, Ana y Gelu.

A los compañeros del laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Medicina: Dani, Pilar, Ana, Fran, Mercedes y Carmen.

A los compañeros del laboratorio de Oncología Molecular: Ricardo, Miguel Ángel, Eva, Clara, Juanlu, Elena, Laura, e Inma.

A todos los que pasaron por el piso durante estos años: Ximo, Amparo, Bea, Patri, Carol, Miguel, Joel y Pablo. Además de piso compartimos buenos ratos.



---

Y para finalizar, aunque no hemos compartido laboratorio, y no están en alguno de los listados anteriores, si los puedo incluir en el de amigos: Silvia, Javi, Sandra, Bea, Eli, Noe, Juani, Carmenchu,.....

Puede que no estén todos los que son, pero estoy seguro de que son todos los que están.

---

El desarrollo de todos los experimentos realizados durante este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la ayuda recibida por la Consejería de Sanidad de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (con referencia: 04072-00).

---

Quisiera también agradecer personalmente a la Fundación Bancaja su apoyo económico, sin el cual no habría podido realizar esta tesis.

## **ÍNDICE DE ABREVIATURAS UTILIZADAS**

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.

**CCR:** Carcinoma de Células Renales.

**DGGE:** (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante.

**TTGE:** (Temporal temperature gradient gel electrophoresis), electroforesis en gel con gradiente de temperatura temporal.

**VHL:** Von Hippel-lindau.

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information.

**MMR:** (Mismatch Repair), reparación de errores de apareamiento.

**MMR+:** (Mismatch Repair Positive) positivo para la actividad de reparación de errores de apareamiento.

**MMR-:** (Mismatch Repair Negative), negativo para la actividad de reparación de errores de apareamiento.

**BER:** (Base Excision Repair), reparación por escisión de bases.

**NER:** (Nucleotide Excision Repair), reparación por escisión de nucleótidos.

**DSBR:** (Double Strand Break Repair), reparación de roturas de doble cadena.

**CIN:** (Chromosomal Instability), inestabilidad cromosómica.

**MSI:** (Microsatellite Instability), inestabilidad de microsatélites.

**MSI+:** (Microsatellite Instability Positive), positivo para inestabilidad de microsatélites.

**MSI-:**(Microsatellite Instability Negative), negativo para inestabilidad de microsatélites.

**MSI-H:** (Microsatellite Instability High), inestabilidad de microsatélites elevada.

**MSI-L:** (Microsatellite Instability Low) inestabilidad de microsatélites baja.

**UICC:** Unión Internacional Contra el Cáncer.

**NK:** Natural Killer.

**IFN- $\alpha$ :** Interferon alfa.

**IL-2:** interleukina 2.

**RER+:** (Replication Error Positive), positivo para errores de replicación.

**RER-:** (Replication Error Negative), negativo para errores de replicación.

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear.

**TAC:** Tomografía Axial Computerizada.

**HNPCC:** (Hereditary Nonpoliposic Colorectal Cancer), cáncer colorrectal hereditario no polipoideo.

**LOH:** (Loss Of Heterozigosity), pérdida de heterocigosidad.

**PCR:** (Polimerase Chain Reaction), reacción en cadena de la polimerasa.

**ng:** nanogramo.

**U:** Unidades de actividad enzimática.

**dNTP:** desoxinucleotido trifosfato.

**Taq:** *Termophilus aquaticus*.

**ÍNDICE DE TABLAS**

**TABLA 1:** Descripción de los distintos grados celulares de Fuhrman.

**TABLA 2:** Clasificación TNM de los tumores renales.

**TABLA 3:** Corrección realizada para el cálculo de LOH.

**TABLA 4:** Secuencia de nucleótidos y temperatura de hibridación de los cebadores utilizados para el estudio de microsatélites.

**TABLA 5:** Secuencia de nucleótidos y temperatura de hibridación de los cebadores utilizados para el estudio de hipermetilación.

**TABLA 6:** Cálculo de la intensidad de las bandas obtenidas como producto de amplificación utilizando como molde ADN digerido con la enzima *HpaII* respecto del control positivo de metilación.

**TABLA 7:** Secuencia y temperatura de hibridación de los cebadores utilizados para el estudio de secuenciación del gen *hMLH1*.

**TABLA 8:** Secuencia y temperatura de hibridación de los cebadores utilizados para el estudio de secuenciación del gen *hMSH2*.

**TABLA 9:** Complicaciones derivadas de la cirugía.

**TABLA 10:** Características anatomopatológicas de los tumores analizados.

**TABLA 11:** Relación entre el tamaño tumoral con el motivo de consulta de los pacientes y localización del tumor.

**TABLA 12:** Distribución de estadios pT según motivo de consulta, localización del tumor, tipo de cirugía y grado nuclear de Fuhrman.

**TABLA 13:** Distribución de estadios pN según estadio pT y grado nuclear de Fuhrman

**TABLA 14:** Distribución de estadios pM según motivo de consulta, grado nuclear de Fuhrman y estadios pT y pN.

**TABLA 15:** Porcentaje de LOH en los casos informativos.

**TABLA 16:** Distribución de LOH según microsatélite analizado y tipo histológico del tumor.

**TABLA 17:** Resultados del análisis densitométrico.

**TABLA 18:** Cambios encontrados en los genes *hMLH1* y *hMSH2*, localización y características clínicas y anatomopatológicas.

**TABLA 19:** Localización y frecuencias genotípicas de los polimorfismos hallados en los genes *hMLH1* y *hMSH2*.

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

**FIGURA1:** Esquema de selección clonal.

**FIGURA2:** Adquisición de fenotipo mutador.

**FIGURA3:** Alteraciones mitóticas en cáncer.

**FIGURA 4:** Alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales en células tumorales.

**FIGURA 5:** Fenómeno del deslizamiento.

**FIGURA 6:** Detección de MSI.

**FIGURA 7:** Representación del nucleosoma.

**FIGURA 8:** Representación de los aminoácidos modificables en cada histona y el tipo de la misma.

**FIGURA 9:** Estructura de los complejos MMR.

**FIGURA 10:** Localización cromosómica de los genes *hMSH2* y *hMLH1*.

**FIGURA 11:** Representación de la ruta bioquímica del factor HIF-1 $\alpha$ .

**FIGURA 12:** Detección de MSI utilizando el panel de microsatélites de Bethesda.

**FIGURA 13:** Detección de LOH.

**FIGURA 14:** Esquema de la metodología utilizada en el estudio de hipermetilación.

**FIGURA 15:** Electroforesis en gel de agarosa de los controles de metilación.

**FIGURA 16:** Esquema de un proceso de PCR.

**FIGURA 17:** Esquema de la reacción de secuenciación.

**FIGURA 18:** Alineamiento de secuencias de ADN.

**FIGURA 19:** Porcentajes de cada uno de los motivos de consulta.

**FIGURA 20:** Grado nuclear y motivo de consulta.

**FIGURA 21:** Ejemplos de pérdida de heterocigosidad en los pacientes del estudio.



**FIGURA 22:** Localización de los microsatélites D2S123, D3S1611, D5S346 y D17S250.

**FIGURA 23:** Análisis del estado de metilación del promotor del gen *hMLH1*.

**FIGURA 24:** Ejemplo representativo de los tumores susceptibles de hemimetilación.

**FIGURA 25:** Mutaciones detectadas en los pacientes de CCR.

**FIGURA 26:** Árboles filogenéticos de los dos enfermos de CCR portadores de mutación con antecedentes familiares de cáncer.

**FIGURA 27:** Comparación de secuencias proteicas para la mutación P349A.

**FIGURA 28:** Comparación de secuencias de las mutaciones no polimórficas.

**FIGURA 29:** Resumen de algunas propiedades físico-químicas de los aminoácidos.

**FIGURA 30:** Estructura secundaria de la proteína *hMLH1* nativa.

**FIGURA 31:** Estructura secundaria de la proteína *hMLH1* con la mutación K618A.

**FIGURA 32:** Estructura secundaria de la proteína *hMLH1* con la mutación V716M.

**FIGURA 33:** Estructura secundaria de la proteína *hMSH2* nativa.

**FIGURA 34:** Estructura secundaria de la proteína *hMSH2* con la mutación I145M.

**FIGURA 35:** Estructura secundaria de la proteína *hMSH2* con la mutación G322D.

**FIGURA 36:** Estructura secundaria de la proteína *hMSH2* con la mutación P349A.

**FIGURA 37:** Distribución de hipermetilación en tumores humanos.

**FIGURA 38:** Supervivencia según distintos genotipos del gen *MLH1* en ratones.

# ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER .....	- 3 -
1.1.1 <i>El origen de inestabilidad genómica</i> .....	- 5 -
1.1.2 <i>Genes implicados en la carcinogénesis</i> .....	- 8 -
1.1.2.1 Oncogenes .....	- 8 -
1.1.2.2 Genes supresores de tumores .....	- 9 -
1.1.2.3 Genes encargados de mantener la estabilidad genómica .....	- 9 -
1.1.3 <i>Tipos de alteraciones en el ADN</i> .....	- 12 -
1.1.3.1 Alteraciones genéticas .....	- 13 -
1.1.3.1.1 Inestabilidad cromosómica .....	- 14 -
1.1.3.1.2 Inestabilidad en secuencias microsatélites (MSI) .....	- 17 -
1.1.3.2 Alteraciones epigenéticas: .....	- 20 -
1.1.3.2.1 Metilación del ADN .....	- 20 -
1.1.3.2.2 Modificación de histonas .....	- 22 -
1.1.4 <i>Los genes reparadores hMLH1 y hMSH2</i> .....	- 25 -
1.1.4.1 El Síndrome de Lynch .....	- 29 -
1.2 INTRODUCCIÓN AL CÁNCER RENAL .....	- 31 -
1.2.1 <i>Epidemiología</i> .....	- 31 -
1.2.2 <i>Biología molecular del CCR</i> .....	- 32 -
1.2.3 <i>Anatomía patológica</i> .....	- 34 -
1.2.3.1 CCR de células claras: .....	- 34 -
1.2.3.2 CCR papilar .....	- 35 -
1.2.3.3 CCR cromófolo .....	- 35 -
1.2.3.4 Carcinoma de los ductos colectores .....	- 36 -
1.2.3.5 Carcinoma sarcomatoide .....	- 36 -
1.2.3.6 Carcinoma de células renales inclasificado .....	- 37 -
1.2.4 <i>Factores pronósticos</i> .....	- 37 -
1.2.4.1 Grado nuclear .....	- 37 -
1.2.4.2 Estadio tumoral .....	- 38 -
1.2.4.3 Otros factores pronósticos .....	- 40 -
1.2.5 <i>Historia natural y tratamiento del adenocarcinoma renal</i> .....	- 41 -
<b>II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>- 45 -</b>
2.1 HIPÓTESIS .....	- 49 -
2.2 OBJETIVOS .....	- 50 -
2.2.1 <i>Principal</i> .....	- 50 -
2.2.2 <i>Secundarios</i> .....	- 50 -
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>- 51 -</b>
3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO .....	- 52 -
3.2 SUJETOS DEL ESTUDIO .....	- 52 -
3.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN .....	- 53 -
3.4 OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....	- 53 -
3.5 VARIABLES DEL ESTUDIO .....	- 53 -
3.5.1 <i>Variables dependientes</i> .....	- 53 -
3.5.1.1 Análisis de secuencias microsatélite .....	- 54 -
3.5.1.2 Análisis del estado de metilación del promotor del gen hMLH1 .....	- 57 -
3.5.1.3 Análisis de las secuencias de nucleótidos de los genes hMLH1 y hMSH2 .....	- 58 -
3.5.1.4 Alineamiento de secuencias de aminoácidos .....	- 59 -
3.5.1.5 Predicción de la estructura secundaria de las proteínas mutantes .....	- 59 -
3.5.2 <i>Variables independientes</i> .....	- 60 -
3.5.2.1 Variables sociodemográficas .....	- 60 -
3.5.2.2 Variables relacionadas con el tumor actual .....	- 60 -
3.6 METODOLOGÍA EMPLEADA .....	- 62 -
3.6.1 <i>Análisis de secuencias microsatélites</i> .....	- 62 -
3.6.2 <i>Análisis del estado de hipermetilación del gen hMLH1</i> .....	- 64 -
3.6.2.1 Digestión de las muestras con enzimas de restricción .....	- 64 -
3.6.2.2 Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	- 65 -
3.6.2.3 Electroforesis en gel de agarosa .....	- 67 -
3.6.2.4 Análisis densitométrico .....	- 68 -

3.6.3 Análisis de la secuencia de nucleótidos de los genes <i>hMSH1</i> y <i>hMSH2</i> .....	- 69 -
3.6.3.1 Diseño de cebadores .....	- 69 -
3.6.3.2 Reacciones de PCR.....	- 70 -
3.6.3.3 Reacción de secuenciación .....	- 73 -
3.6.4 Alineamiento de secuencias de aminoácidos .....	- 76 -
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	- 76 -
3.7.1 Análisis descriptivo.....	- 76 -
3.7.2 Análisis bivalente .....	- 77 -
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>- 79 -</b>
4.1 RECOGIDA DE LAS MUESTRAS .....	- 80 -
4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES .....	- 80 -
4.2.1 Motivo de consulta.....	- 81 -
4.2.2 Lateralidad y localización tumoral.....	- 82 -
4.2.3 Tratamiento de los pacientes .....	- 82 -
4.2.4 Complicaciones .....	- 83 -
4.2.5 Características macroscópicas del tumor. ....	- 84 -
4.2.5.1 Tamaño del tumor.....	- 84 -
4.2.5.2 Tipo histológico.....	- 87 -
4.2.5.2 Grado nuclear. ....	- 87 -
4.2.5.3 Estadio tumoral primario (pT). ....	- 89 -
4.2.5.4 Estadio de afectación ganglionar regional (pN). ....	- 90 -
4.2.5.5 Presencia de metástasis a distancia (pM). ....	- 92 -
4.2.5.6 Estadio TNM y asociación con otros tumores. ....	- 93 -
4.3 ANÁLISIS DE SECUENCIAS MICROSATÉLITE .....	- 94 -
4.4 ANÁLISIS DE HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN <i>hMLH1</i> .....	- 98 -
4.5 ANÁLISIS DE MUTACIONES EN LOS GENES <i>hMLH1</i> Y <i>hMSH2</i> .....	- 102 -
4.6 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS. ....	- 108 -
4.7 PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA .....	- 111 -
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>- 120 -</b>
5.1 COMENTARIOS AL MÉTODO.....	- 121 -
5.1.1 Tipo de estudio.....	- 121 -
5.1.2 Características de los pacientes de la muestra.....	- 122 -
5.1.3 Estudio genético de las muestras.....	- 126 -
5.1.3.1 Extracción de ADN .....	- 127 -
5.1.3.2 Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa .....	- 128 -
5.1.3.3 Reacción de secuenciación .....	- 129 -
5.1.3.4 Análisis de microsatélites .....	- 130 -
5.1.3.5 Estudio de hipermetilación del promotor del gen <i>hMLH1</i> .....	- 132 -
5.2 COMENTARIOS AL RESULTADO DE LA BÚSQUEDA DE MUTACIONES .....	- 134 -
5.3 COMENTARIOS AL RESULTADO DEL ESTUDIO DE HIPERMETILACIÓN.....	- 137 -
5.4 COMENTARIOS A LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES .....	- 141 -
5.5 COMENTARIOS FINALES .....	- 144 -
5.5.1 Comentarios respecto a la haploinsuficiencia.....	- 145 -
5.5.2 Comentarios respecto a nuevas funciones de los genes <i>MMR</i> .....	- 147 -
5.5.3 Relación entre defectos en los genes <i>MMR</i> y resistencia al tratamiento.....	- 148 -
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>- 149 -</b>
<b>VII. RESUMEN .....</b>	<b>- 151 -</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>- 157 -</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>- 157 -</b>
<b>IX. ANEXO .....</b>	<b>- 174 -</b>
COMUNICACIONES A CONGRESOS.....	- 175 -
PREMIOS DE INVESTIGACIÓN RECIBIDOS .....	- 177 -
PUBLICACIONES .....	- 178 -

# **I. INTRODUCCIÓN**

El cáncer constituye la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados, únicamente superada por las enfermedades cardiovasculares. Cada vez más se está produciendo un aumento en la incidencia del cáncer, fundamentalmente debido al incremento en la esperanza de vida media de la población, pues la edad es el principal factor de riesgo para padecerlo. Para frenar el incremento de esta enfermedad es necesario caracterizar lo mejor posible los mecanismos que la originan, lo que puede permitir el desarrollo de nuevas terapias más efectivas. Desde este punto de vista el análisis molecular nos ofrece herramientas muy útiles a todos los niveles, desde el diagnóstico al pronóstico y desde la respuesta al tratamiento hasta la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

Los genes reparadores han sido ampliamente estudiados en distintos tipos tumorales, como el cáncer colorrectal, donde originan la alteración hereditaria más común, denominado Síndrome de Lynch <sup>1</sup>. También se han descrito defectos de estos genes en otros tipos tumorales como cáncer de endometrio, estómago y ovario <sup>2</sup>. Estos cuadros se caracterizan por la inactivación de estos genes reparadores tanto por mutación (principalmente en los casos hereditarios) como por hipermetilación de su región promotora (principalmente en los esporádicos) <sup>3</sup>. Sin embargo los genes reparadores apenas han sido estudiados en cáncer renal. Para comprender el presente estudio, así como los aspectos básicos de la génesis de esta enfermedad, haremos una introducción a la genética molecular del cáncer en general, a las causas genéticas y epigenéticas, a la biología molecular del cáncer renal, y a la estructura y función de los genes reparadores.

## **1.1 GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER**

Denominamos cáncer a un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de un grupo de células que originan la formación de un tumor. Este crecimiento puede deberse tanto a un aumento de su proliferación como a la inhibición de los procesos de muerte celular (apoptosis). La posterior adquisición por alguna de estas células de la capacidad de abandonar el tumor original y colonizar otros tejidos (metástasis) supone un empeoramiento en el pronóstico de la enfermedad, que reduce sustancialmente la probabilidad de supervivencia. Aunque este proceso es común a todos los tipos tumorales, no podemos tratarlo como una misma enfermedad, puesto que dependiendo del tejido donde aparezca y de las alteraciones genéticas que hayan sufrido las células que lo componen, se comportará de forma distinta.

El cáncer es una enfermedad genética, ya que está causada por mutaciones en genes que controlan la división y proliferación celular <sup>4</sup>. Estos cambios pueden afectar a la secuencia de nucleótidos (mutaciones puntuales, translocaciones cromosómicas, deleciones, inserciones), o ser cambios que no afectan a la secuencia pero sí al modo de expresión de los genes, denominados cambios epigenéticos. Estas alteraciones pueden ser de origen esporádico (en la mayoría de los casos), o de carácter hereditario. En este último caso el paciente hereda una copia mutada del gen por parte de algunos de sus progenitores, y posteriormente sufre una segunda mutación en la copia normal del mismo gen, mientras que en los casos esporádicos ambas mutaciones suceden independientemente.

Las mutaciones que conducen a la aparición de un cáncer pueden afectar a tres tipos de genes según la función que estos cumplen en la regulación del ciclo celular:

proto-oncogenes, genes supresores de tumor (dentro de los cuales podríamos englobar los genes encargados de desencadenar el proceso de apoptosis), y genes responsables de mantener la estabilidad genética. Estos últimos están implicados de forma indirecta, ya que no controlan el ciclo celular, sin embargo una disfunción de los mismos conduce a un incremento de la tasa de mutación y con ello un aumento en la probabilidad de sufrir la enfermedad. Dentro de este grupo se incluyen los genes reparadores de apareamientos erróneos, denominados por sus siglas en inglés MMR (*mismatch repair genes*). La inactivación de estos genes conduce a una rápida acumulación de mutaciones, debido a lo cual se les ha denominado también genes mutadores.

Las alteraciones genéticas que debe sufrir una célula para convertirse en cancerosa le confieren cualidades especiales, las cuales se pueden resumir en tres grupos:

**1) Inmortalización:** Se refiere a la capacidad de crecer indefinidamente, al contrario de las células normales que tienen un número de divisiones limitado.

**2) Transformación:** Alude a la incapacidad de la célula para obedecer a las limitaciones habituales del crecimiento (inhibición por contacto y factores de crecimiento).

**3) Metástasis:** Describe la adquisición de la capacidad por parte de la célula para abandonar el tumor e invadir otros tejidos normales. La metástasis marca la diferencia entre un tumor clínicamente benigno y uno maligno (capaz de invadir otros tejidos).

En los siguientes apartados se repasan los principales aspectos de la genética molecular del cáncer en general, desde las causas que lo originan hasta los tipos de alteraciones genéticas y epigenéticas que puede mostrar. En la última parte se hace un

repaso más a fondo de los genes reparadores, que han sido el objeto de estudio en el presente trabajo.

### **1.1.1 El origen de inestabilidad genómica**

El cáncer es una enfermedad originada por mutaciones <sup>5</sup>, muchas de ellas suceden durante la replicación del ADN, pues aunque los mecanismos de replicación poseen una alta fidelidad de copia, el enorme tamaño del genoma hace que la probabilidad de que se generen algunos errores sea considerable. Otra fuente de mutación son las alteraciones que suceden cuando los cromosomas se encuentran condensados, que provocan variaciones en cuanto a la estructura y número de los mismos, y que pueden estar provocadas por agentes mutagénicos.

Las mutaciones también pueden estar provocadas por la modificación química de las bases nitrogenadas. Este fenómeno es espontáneo y está originado tanto por causas endógenas, como el daño oxidativo (provocado por la aparición de formas tóxicas del oxígeno como radicales superóxido, hidroxilo y peróxido de hidrogeno) <sup>6</sup>, como exógenas (agentes mutagénicos físicos y químicos). Estas modificaciones conducen a la aparición de cambios en la secuencia de nucleótidos, y provocan la introducción de bases nitrogenadas incorrectas durante la síntesis de ADN. Muchos de estos cambios son inevitables y se deben a la existencia de formas tautoméricas "raras" de las bases que coexisten con las normales mediante un equilibrio químico. Las bases nitrogenadas pirimidínicas (timina y guanina) se encuentran normalmente en su forma cetónica y con menor frecuencia en su forma enólica, con una constante de equilibrio del orden de  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$ , de igual forma, las bases nitrogenadas purínicas (citosina y adenina) presentan otro tipo de tautomería denominada amino-imino. El paso de una



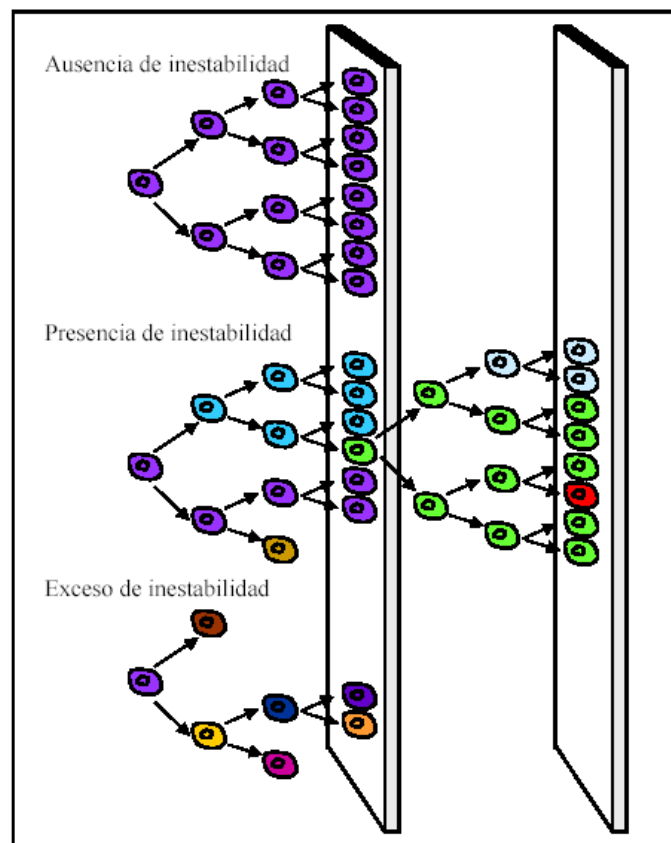
base a su forma tautomérica puede producir apareamientos incorrectos, como A-C y T-G. Sin embargo, la capacidad de la ADN polimerasa para corregir los errores de la replicación del ADN, así como la existencia de otros mecanismos de reparación adicionales que mantienen la estabilidad del genoma, hacen que la frecuencia de cambios o mutaciones sea menor a la esperada. No obstante, la exposición de la célula a agentes mutagénicos puede hacer aumentar esta tasa considerablemente <sup>7</sup>.

Se estima que la tasa normal de incorporación de errores por parte de la ADN polimerasa es de una por cada  $10^5$ - $10^6$  nucleótidos polimerizados <sup>8</sup>. A esta tasa se debe sumar la capacidad de la polimerasa para corregir sus propios errores y la función de los genes reparadores que aumentan la fidelidad del proceso entre 100-1000 veces, lo cual asegura la estabilidad de la información durante el proceso de replicación.

Distintos estudios han estimado que la mayoría de tipos tumorales requieren de seis a diez mutaciones para llegar a adquirir un fenotipo maligno <sup>9-11</sup>. Sin embargo la baja tasa de mutación que presenta una célula normal hace improbable que ésta llegue a acumular el gran número de alteraciones genéticas detectadas en los tumores <sup>12</sup>. En un intento de explicar el gran número de mutaciones detectadas en los tumores, Loeb propuso la hipótesis del “fenotipo mutador” <sup>13</sup>, en la cual se postula que la disfunción de los genes responsables de mantener la estabilidad genética, tanto a nivel nucleotídico como cromosómico, sería un evento temprano en la progresión tumoral. De esta forma la célula poseería una tasa de mutación mucho más elevada de lo esperado en condiciones normales <sup>14</sup>.

En cada ronda de replicación las células van acumulando una serie de mutaciones. La mayoría de estos errores afectarían a regiones intergénicas que serán irrelevantes para la vida de la célula, y otros pueden ser perjudiciales para su viabilidad.

Sin embargo alguna de las alteraciones puede conferir a la célula una ventaja selectiva, de forma que esa célula puede dar lugar a una subpoblación o clon que posee una ventaja frente a otras, y que a su vez es capaz sufrir nuevas mutaciones <sup>15</sup>. Haciendo referencia a la teoría de la evolución, y teniendo en cuenta que las mismas leyes que la gobiernan se pueden aplicar a la evolución de un tumor, podemos decir que los procesos de variación (mutación) y selección de los clones mejor adaptados a las restricciones impuestas por el entorno donde se originan, son los responsables de promover la progresión tumoral, siendo el acúmulo secuencial de alteraciones genéticas las que provocan la malignización de una célula (**figura 1**) <sup>16,17</sup>.



**Figura 1: Esquema de selección clonal tumoral.** Los fenómenos de inestabilidad favorecen la aparición de subpoblaciones con capacidad de saltarse las barreras de control de la proliferación. Un exceso de inestabilidad puede ser letal (adaptado de Cahill 1999)<sup>17</sup>.

### 1.1.2 Genes implicados en la carcinogénesis

Puesto que son mutaciones en ciertos genes las causantes de los desórdenes del ciclo celular, debemos tratar de comprender cómo funcionan estos genes. Se pueden clasificar en tres tipos según su función:

#### 1.1.2.1 Oncogenes

Fueron el primer grupo de genes que se asociaron con el cáncer. Las versiones no mutadas de éstos se denominan proto-oncogenes y codifican proteínas involucradas en crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. Su expresión excesiva o la expresión de formas mutadas inducen la transformación de las células normales en cancerosas. Las mutaciones que activan a los proto-oncogenes incluyen mutaciones puntuales (*K-ras*)<sup>18</sup>, amplificaciones génicas (*C-myc*)<sup>19</sup> o translocaciones cromosómicas (*Bcr/Abl*)<sup>20</sup>, las cuales desregulan su expresión génica o generan una proteína quimérica con una función anormal provocando una ganancia de función del proto-oncogen

Además de estos mecanismos se conocen virus que contienen oncogenes homólogos a los humanos y que pueden provocar la enfermedad, aunque el número de tumores provocados por éstos es mínimo respecto a los de aparición espontánea<sup>21</sup>.

Los oncogenes actúan como un acelerador del proceso de división celular, cuando se produce un aumento en la actividad de la proteína codificada por estos genes la célula pierde su control y se divide más rápido. La alteración de uno sólo de los dos alelos es suficiente para hacer perder el control, por tanto las mutaciones en estos genes tienen carácter dominante.

### **1.1.2.2 Genes supresores de tumores**

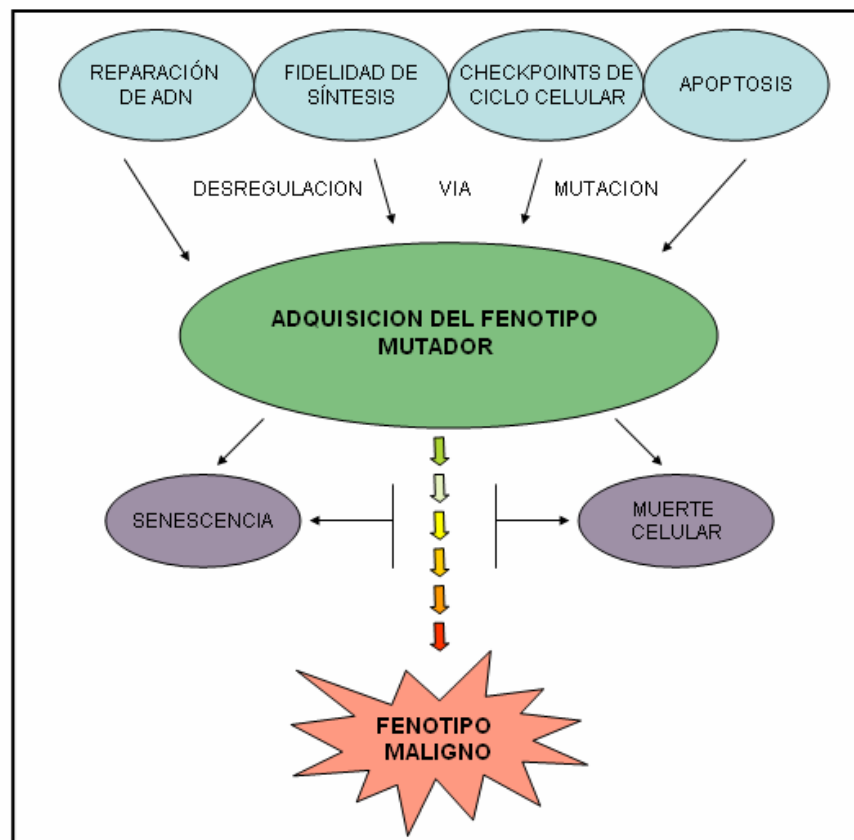
Representan un mecanismo opuesto de control del ciclo celular al realizado por los proto-oncogenes, normalmente inhibiendo la proliferación celular y el desarrollo del tumor. En su caso es necesaria la inactivación de ambas copias del gen para que se pierda el control del mecanismo que regulan. Este hallazgo fue propuesto por Knudson en 1971 estudiando el gen *RBI* y se conoce como hipótesis de los dos impactos <sup>22</sup>.

La mayoría de cánceres hereditarios están provocados por la herencia de una copia de un gen supresor mutado, el cual está presente en todas las células del organismo y constituye el primer impacto. En el transcurso de la vida se produce la pérdida o inactivación del alelo normal en alguna célula somática (segundo impacto). Sin ninguna copia funcional del gen, la célula es incapaz de regular su ciclo. Por esta razón los individuos portadores de una mutación germinal tienen mayor susceptibilidad a sufrir ciertos tipos de cáncer que un individuo no portador de mutación, puesto que en este último deben producirse de forma independiente los dos procesos mutacionales en una misma célula. Aproximadamente entre el 5-10% de los tumores humanos están provocados por la transmisión de un gen supresor mutado. La segunda copia se suele inactivar por mutación, hipermetilación del promotor o pérdida cromosómica <sup>23</sup>.

### **1.1.2.3 Genes encargados de mantener la estabilidad genómica**

La implicación de estos genes en el desarrollo tumoral se produce de forma indirecta, puesto que no están implicados directamente en el control de la división y proliferación celular. Sin embargo, un defecto en los mismos puede provocar un gran aumento en la tasa de inestabilidad genómica. Actualmente se acepta que el cáncer se

origina por la acumulación de mutaciones en genes que controlan directamente la división y la muerte celular. Este acúmulo secuencial se ha demostrado en distintos tipos tumorales como melanoma <sup>24</sup> y colon <sup>25</sup>. Todos ellos manifiestan un alto número de alteraciones que son difícilmente explicables teniendo en cuenta la eficacia de los procesos de copia <sup>14</sup>. La hipótesis del “fenotipo mutador” postula que la disfunción de los genes implicados en mantener la estabilidad genómica sería un evento temprano en la progresión tumoral <sup>26</sup>. Posteriormente a la adquisición de dicho “fenotipo mutador”, la célula afectada presentará una tasa de inestabilidad lo suficientemente elevada como para justificar la génesis tumoral (**Figura 2**)



**Figura 2: Adquisición del fenotipo mutador** En la figura se muestra como una primera mutación en cualquiera de los genes encargados de mantener la estabilidad genómica provoca la adquisición de un fenotipo con mayor probabilidad de sufrir mutaciones. Posteriormente la célula y sus descendientes van acumulando la gran cantidad de mutaciones necesarias para generar un tumor y evitar los mecanismos de senescencia y muerte (Figura adaptada de Venkatesan et al 2006) <sup>27</sup>

Actualmente se conocen varios mecanismos encargados de mantener la estabilidad genómica. La inactivación de éstos provoca en humanos una serie de síndromes que cursan con un aumento en la probabilidad de sufrir ciertos tipos tumorales. Los cuatro mecanismos principales de reparación del ADN son:

- a) Reparación por escisión de bases o **BER** (*Base Excision Repair*), que repara las modificaciones de nucleótidos provocadas por el estrés oxidativo, como son la alquilación de bases y roturas de cadena simple del ADN.
- b) Reparación por escisión de nucleótido o **NER** (*Nucleotide Excision Repair*), que repara sobre todo las lesiones provocadas por la luz ultravioleta, tales como los dímeros de timina.
- c) Reparación de roturas de doble cadena o **DSBR** (*Double Strand Break Repair*), generadas principalmente por radiación ionizante o compuestos químicos.
- d) Reparación de errores de apareamiento o **MMR** (*Mismatch Repair*), capaz de reconocer los bucles y distorsiones creados en la doble hélice cuando las bases nitrogenadas no son complementarias.

Uno de los últimos mecanismos descrito encargado del mantenimiento de la estabilidad genómica es el que implica a las helicasas de la familia RecQ. Las helicasas son proteínas encargadas de separar las hebras de ADN en procesos como la replicación y la reparación, y se ha observado que pueden interaccionar con los sistemas de reparación BER, MMR y DSBR facilitando su función. Defectos en estas proteínas provocan los Síndromes de Werner, Bloom y Rothmund-Thompson, todos

ellos caracterizados por la presencia de inestabilidad genómica, envejecimiento prematuro y una mayor probabilidad de sufrir cáncer<sup>28</sup>.

Defectos en los sistemas BER, NER, MMR provocan la acumulación de mutaciones puntuales o de pequeño tamaño, y los tumores generados por defectos en estos sistemas mantienen un genoma diploide<sup>29</sup>. Sin embargo la alteración genética más común que afecta a la mayoría de tipos tumorales es la que implica a grandes fragmentos de material genético<sup>30</sup>. Este hecho nos revela la existencia de distintos mecanismos para la adquisición de la inestabilidad, y por tanto, la existencia de distintos tipos de inestabilidad. Esta inestabilidad genómica se puede dividir en dos grandes grupos: la que produce mutaciones puntuales, generada por defectos en los sistemas BER, NER, MMR, y la que afecta a grandes regiones cromosómicas, causada por defectos en los genes reguladores de los “*checkpoints*” de mitosis y de daño genómico<sup>30</sup>.

### 1.1.3 Tipos de alteraciones en el ADN

Podríamos resumir las alteraciones que sufre el material genético en 2 tipos:

**a) Alteraciones genéticas:** Afectan a fragmentos más o menos grandes de ADN, que pueden ser desde una mutación puntual que provoca el cambio de una base, hasta la pérdida o ganancia de cromosomas enteros.

**b) Alteraciones epigenéticas:** Son alteraciones que no afectan a la secuencia de bases pero alteran la expresión de los genes. Ejemplos de este tipo de alteración son la hipermetilación de las regiones promotoras de los genes, y la modificación de histonas (metilación, acetilación y fosforilación).

### **1.1.3.1 Alteraciones genéticas**

Se producen como consecuencia de una tasa de mutación elevada en las células, bien sea ésta espontánea o debida a la exposición a agentes mutagénicos. En la actualidad se ha establecido que la inestabilidad genómica es una característica importante de procesos como el cáncer y el envejecimiento celular. Sin embargo, en células normales, a pesar de la gran cantidad de daño que sufre su ADN, la tasa de mutación espontánea es baja debido a que los procesos de replicación, reparación y control del ciclo celular funcionan correctamente. Cuando esto no sucede la tasa de inestabilidad se incrementa <sup>31</sup>. En células tumorales existen dos tipos de inestabilidad generadas a partir de vías diferentes:

a) Inestabilidad a nivel cromosómico: que afecta a fragmentos grandes de material genético y puede dividirse en dos tipos, las alteraciones estructurales (translocaciones, deleciones, duplicaciones, inversiones), y las alteraciones numéricas (aneuploidía).

b) Inestabilidad en la secuencia de nucleótidos del ADN, cuya extensión es de una o unas pocas bases (mutaciones puntuales o pequeñas deleciones-inserciones en secuencias microsatélite).

Ambos tipos de inestabilidad parecen ser excluyentes, de forma que cuando un tumor manifiesta una de ellas no suele manifestar la otra <sup>29</sup>.



#### 1.1.3.1.1 Inestabilidad cromosómica

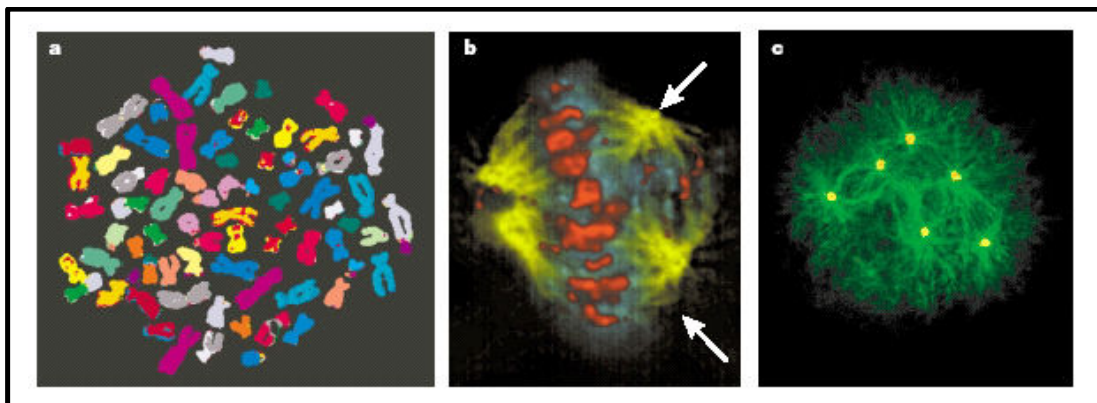
La presencia de inestabilidad cromosómica (CIN) es la alteración genética más común en la mayoría de los tipos tumorales <sup>29,30</sup>. Entre los genes causantes de CIN se encuentran aquellos implicados tanto en la correcta separación de cromosomas durante la mitosis, como en la detección de daño genómico y bloqueo de la progresión del ciclo. A estos mecanismos se les denomina puntos de control o “*checkpoints*”. La progresión del ciclo celular es un mecanismo altamente regulado que asegura la correcta transmisión de la información desde una célula a sus hijas, siendo los “*checkpoints*” los encargados de asegurar el orden y fidelidad de los procesos del ciclo celular <sup>32</sup>.

Dentro de la fase S del ciclo celular hay varios puntos de control. Por ejemplo, uno de ellos evita la entrada en mitosis hasta que el ADN se ha replicado completamente <sup>33</sup>. Una vez en mitosis, existe otro “*checkpoint*” encargado de la correcta formación del huso acromático, y asegura que las cromátidas no se separen hasta que los cromosomas se alineen correctamente. En levaduras la inactivación de genes que controlan este mecanismo provoca CIN debido a una segregación cromosómica anormal <sup>34</sup>. Varias evidencias apoyan que los “*checkpoints*” estén relacionados con el origen de CIN:

a) La primera es la observación de que líneas celulares que manifiestan CIN no responden correctamente a agentes que interfieren en la formación del huso. Estas líneas, en vez de quedar detenidas en la mitosis, consiguen iniciar un nuevo ciclo de división <sup>35</sup>.

b) La segunda es la alteración tanto en la expresión como en la secuencia de genes implicados en este “*checkpoint*” que se ha observado en tumores humanos, como por ejemplo la disminución de expresión del gen *hMAD2* en cáncer de mama <sup>36</sup>.

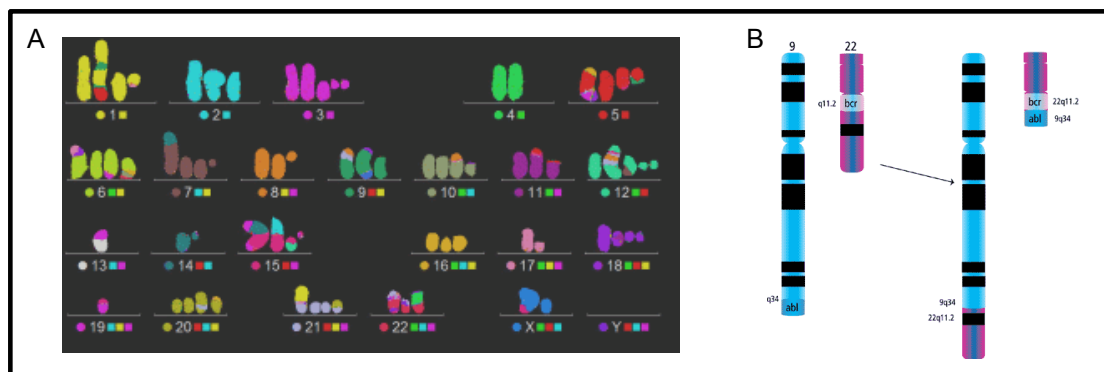
Otros genes encargados del “*checkpoint*” de mitosis son *hBUB1* y *hBUBR1*, mutaciones o reducción de la expresión de los mismos provocan CIN <sup>37</sup>. También están implicados en este punto de control genes encargados de regular la función del kinetocoro y el centrosoma <sup>38</sup>. Este orgánulo está encargado de la correcta separación de las cromátidas para asegurar un reparto equitativo de material genético. En tumores de mama, pulmón, próstata, colon y cerebro se ha observado la presencia de un número anormal de centrosomas <sup>39</sup>. **(Figura 3)**



**Figura 3: Alteraciones mitóticas en cáncer.** A) Ejemplo de aneuploidía en células tumorales. Los cromosomas han sido coloreados utilizando sondas específicas, observándose que algunos cromosomas aparecen en números de tres o más. B) Ejemplo de formación anormal del huso mitótico, donde se aprecian 4 polos en vez del número normal de 2. C) Ejemplo de amplificación de centrosomas (figura adaptada de Jallepalli, P.V. & Lengauer, C. 2001) <sup>40</sup>.

Otro tipo de “*checkpoint*” es el implicado en el control de daño genómico, el cual comprende a las proteínas que funcionan como sensores del daño genómico, aquellas encargadas de la transducción de la señal y las proteínas efectoras encargadas de bloquear el ciclo, iniciar la reparación y desencadenar fenómenos como la senescencia y la apoptosis cuando el daño es irreparable <sup>41</sup>.

En respuesta a daño en el ADN, las quinasas ATM y ATR son las primeras en activarse y a su vez activan a las quinasas CHK1 y CHK2. CHK1 marca para su degradación a la ciclina cdc25A, la cual es necesaria para la progresión del ciclo celular y como consecuencia la célula queda detenida en la transición G1/S<sup>42</sup>. Actualmente se postula que CHK1 es la principal quinasa de “*checkpoint*” de daño genómico, mientras que CHK2 funcionaría complementando la función de CHK1 en respuesta a ciertos tipos de daño, como las roturas de doble cadena, y actuando como amplificador de la respuesta. Además, ATM/ATR y CHK1/CHK2 estabilizan a p53 lo que provoca una detención más prolongada del ciclo celular<sup>43</sup>, siendo CHK2 la principal quinasa implicada en desencadenar tanto la apoptosis como la senescencia vía p53<sup>44</sup>. En resumen, como resultado del mal funcionamiento de estos “*checkpoints*” se producirá una acumulación de aberraciones cromosómicas, tanto estructurales (translocaciones, inversiones, deleciones y duplicaciones de fragmentos) como numéricas (aneuploidías) (Figura 4)



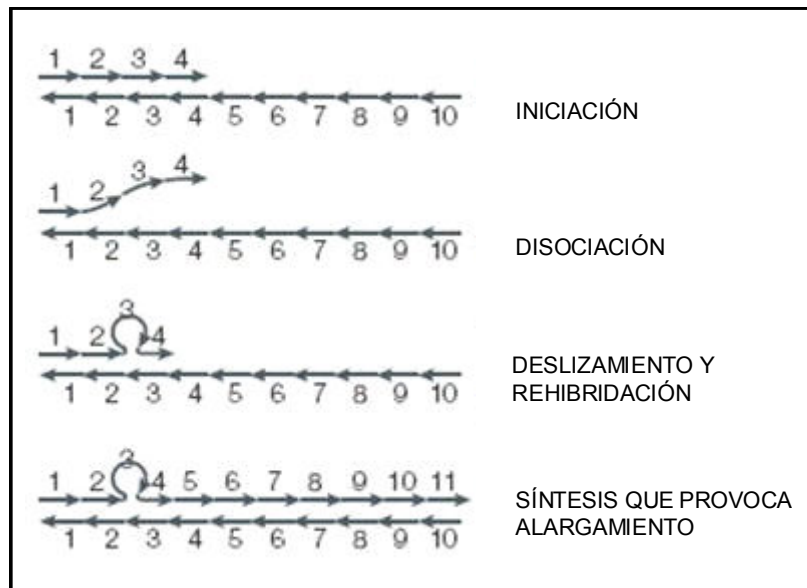
**Figura 4: Alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales en células tumorales.** A) Cariotipo perteneciente a una línea celular tumoral, que se ha hibridado con sondas fluorescentes específicas para cada cromosoma. Se observa el elevado número de alteraciones tanto numéricas como estructurales B) Translocación entre los cromosomas 9 y 22 (9; 22), característica de casi el 100% de los casos de leucemia mieloide crónica

#### 1.1.3.1.2 Inestabilidad en secuencias microsatélites (MSI)

Los microsatélites son secuencias cortas, de entre 1 y 6 pares de bases de ADN repetitivo, altamente polimórficas, distribuidas a lo largo de todo el genoma <sup>45</sup>. Los microsatélites son especialmente susceptibles de sufrir mutaciones de tipo inserción-delección durante la replicación y la recombinación, lo cual les hace ser las regiones del genoma con la tasa de mutación espontánea más elevada ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$ ) <sup>46,47</sup>. A este tipo de inestabilidad causada por inserciones o deleciones en secuencias microsatélite se le denomina inestabilidad de microsatélites (MSI), y la existencia de la misma está directamente relacionada con defectos en la función MMR. Actualmente se conocen cuales son las causas iniciales de este tipo de inestabilidad:

##### a) Deslizamiento de las hebras de ADN durante la replicación

Durante la replicación se produce la disociación-reasociación de las hebras complementarias y en las regiones que poseen secuencias repetidas las hebras se pueden deslizar una sobre otra, sin que se pierda la complementariedad. Al hacerlo se genera un bucle en mitad de la secuencia repetitiva que provocará un cambio en la longitud de una de ellas. A este fenómeno también se le conoce como patinaje o “*slippage*” <sup>48</sup>. Como consecuencia de ello, tras la división celular una de las hijas será normal, pero la otra habrá perdido o ganado una repetición en su secuencia, ya sea ésta de uno, dos, tres o más nucleótidos (**Figura 5**).

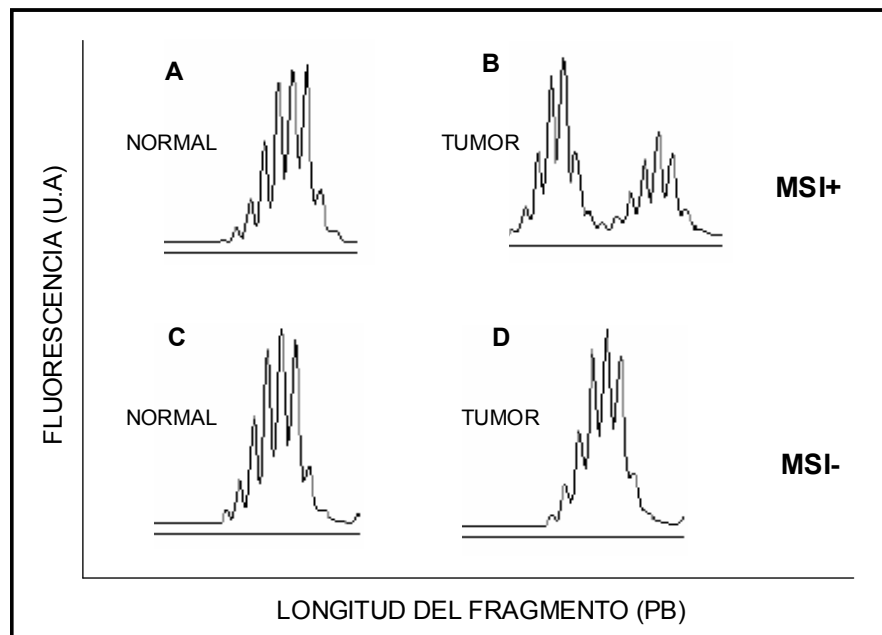


**Figura 5: Fenómeno del deslizamiento:** en la célula progenitora se produce un bucle durante la replicación. La hebra original (abajo) tiene 10 repeticiones, la sintetizada 11 (arriba), si este error no es corregido, en la siguiente generación la mitad de las células tendrán 10 repeticiones y la otra mitad 11.

## b) Recombinación

Los procesos de recombinación que pueden ocurrir entre cromátidas hermanas o entre cromosomas homólogos también pueden alterar la longitud de las secuencias repetitivas. Sin embargo, esta fuente de mutación parece ser minoritaria respecto al deslizamiento<sup>47</sup>.

En condiciones normales los errores generados tanto por deslizamiento como por recombinación son corregidos por el sistema de reparación de errores de apareamiento. De no llevarse a cabo esta reparación, observaríamos una heterogeneidad en cuanto al tamaño de los microsatélites, fenómeno conocido como MSI. La presencia de MSI es una característica común a los tumores originados por defectos en los genes MMR (**Figura 6**).



**Figura 6: Detección de MSI.** Electroforesis capilar de productos de amplificación por PCR de 2 tumores (MSI+ y MSI-) comparados con tejido normal del mismo paciente. Se aprecia que en el tumor con inestabilidad (MSI+) existe heterogeneidad en la longitud de los fragmentos de ADN microsatélite amplificado, causada por un defecto en los genes MMR. (PB: pares de bases).

La primera evidencia de una alteración en la longitud de secuencias repetitivas fue observada por Ionov en pacientes de cáncer colorrectal hereditario no polipoides (HNPCC) <sup>49</sup>. Este tipo tumoral mostraba un alto grado de inestabilidad en secuencias repetitivas del genoma, y se bautizó al fenómeno como inestabilidad de microsatélites (MSI) <sup>50,51</sup>.

En tumores con MSI se ha observado una elevada incidencia de mutaciones en genes esenciales en el ciclo celular como *TGFβrII* y *BAX* <sup>52</sup>. Estos genes presentan un microsatélite en su secuencia, lo que les hace especialmente sensibles a sufrir el deslizamiento de las hebras de ADN durante su replicación. En ausencia de la función de los genes MMR los errores no son corregidos, siendo éste el motor que dirige a la célula hacia su malignización. El gen *TGFβrII* codifica para un receptor de TGF (*tumor growth factor*), cuya función es mantener a las células detenidas en G<sub>0</sub>. Tiene una

región con 10 repeticiones consecutivas de la base nitrogenada adenina en su secuencia y presenta mutaciones en el 90% de los tumores con MSI <sup>53</sup>. El gen *BAX* tiene 8 repeticiones de guanina, su función es promover la apoptosis, y presenta mutaciones en el 50% de los tumores con MSI <sup>54</sup>. Otros genes reparadores como *MSH3* y *MSH6*, también presentan microsatélites en su secuencia, y aparecen alterados en el 40% y 30% respectivamente de los tumores con MSI <sup>55</sup>.

### **1.1.3.2 Alteraciones epigenéticas:**

El término epigenética se refiere a la información que porta el material genético y que sin embargo es independiente de su secuencia. Se conocen varios tipos de regulación epigenética, siendo la metilación de las regiones promotoras de los genes el mejor estudiado. Otra forma de regular la expresión es la modificación de histonas (metilación, acetilación, fosforilación), que modula la forma en la que se pliegan éstas haciendo más o menos accesible la secuencia del ADN a la maquinaria encargada de la transcripción.

Estos fenómenos, además de la función normal que tienen en el desarrollo de un organismo, pueden también jugar un papel en estados patológicos mediante activación de genes que no deben estar expresándose, o silenciamiento de otros que sí son necesarios.

#### **1.1.3.2.1 Metilación del ADN**

En las regiones promotoras de los genes existen zonas ricas en el dinucleótido CG conocidas como islas CpG. Estas zonas son capaces de ser metiladas y regular de esta forma la unión de factores transcripcionales, y por tanto la expresión del gen. Las

enzimas encargadas de metilar el ADN son las ADN metil-transferasas, de las que se conocen varias:

**DNMT1:** fue la primera que se identificó. Actúa acoplada a la maquinaria replicativa y su función es mantener el patrón de metilación durante la replicación. Para ello metila la hebra naciente siguiendo como patrón a la hebra molde <sup>56</sup>. Una prueba de su importancia es que un organismo en el cual se elimina el gen que la codifica (“*knock-out*”) muere tempranamente durante el desarrollo embrionario <sup>57</sup>.

**DNMT2:** Parece tener una escasa actividad <sup>58,59</sup>.

**DNMT3A y DNMT3B:** Fueron identificadas poco después realizando comparación de secuencias en bases de datos. Son responsables de la metilación “de novo” del ADN, particularmente durante la embriogénesis. Su actividad se reduce durante la diferenciación, y permanece baja en tejidos somáticos en el adulto <sup>60</sup>.

La expresión de DNMT3A es ubicua, mientras que DNMT3B se expresa a bajos niveles en la mayoría de tejidos <sup>61</sup>. La expresión de DNMT3B se ha observado enormemente incrementada en varias líneas celulares tumorales, indicando que podría jugar un papel importante en la tumorigénesis <sup>61,62</sup>. Además DNMT3A y DNMT3B han demostrado ser responsables de los patrones de metilación observados en las primeras etapas de la gametogénesis masculina <sup>63</sup>.

Los patrones de metilación tienen un papel todavía no bien conocido, pero se pueden transmitir de una célula a sus descendientes. Se conoce como impronta genómica a la modificación epigenética de una región génica en el gameto o cigoto que producirá una expresión diferencial de los dos alelos en las células de la descendencia. También se conoce que existen proteínas capaces de unirse de manera específica a las zonas metil-CpG <sup>64</sup>. La primera que se descubrió fue MeCP2 (*methyl-CpG binding*



*protein 2)* y la búsqueda en bases de datos permitió identificar otras cuatro proteínas con homología de secuencia: MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4 <sup>65</sup>.

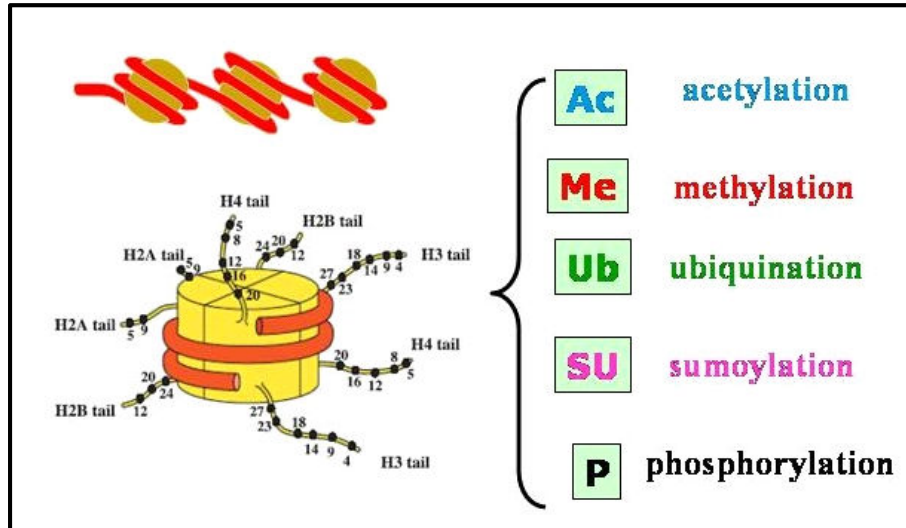
La metilación también parece tener un importante papel durante el desarrollo del embrión <sup>66</sup> habiéndose observado cambios en los patrones de metilación durante el desarrollo embrionario; por ejemplo uno de los cromosomas X en mujeres se silencia mediante este sistema <sup>67</sup>. Los gametos aparecen altamente metilados, sobre todo el espermatozoide <sup>68</sup>. Tras la fecundación sucede una amplia desmetilación del genoma, y posteriormente comienza de nuevo una amplia metilación que varía según los linajes celulares.

La metilación, además de tener un papel regulador del desarrollo, también puede tener un papel patológico en el individuo adulto al provocar el silenciamiento de un gen que en condiciones normales debería estar expresándose. La relación entre metilación de la región promotora y el silenciamiento de la expresión del gen ha sido ampliamente documentado <sup>69-71</sup>. Además se ha evidenciado una relación lineal entre el incremento de la metilación del genoma y el envejecimiento <sup>72</sup>; fenómeno que se ha observado también en tumores y en células en cultivo <sup>73</sup>.

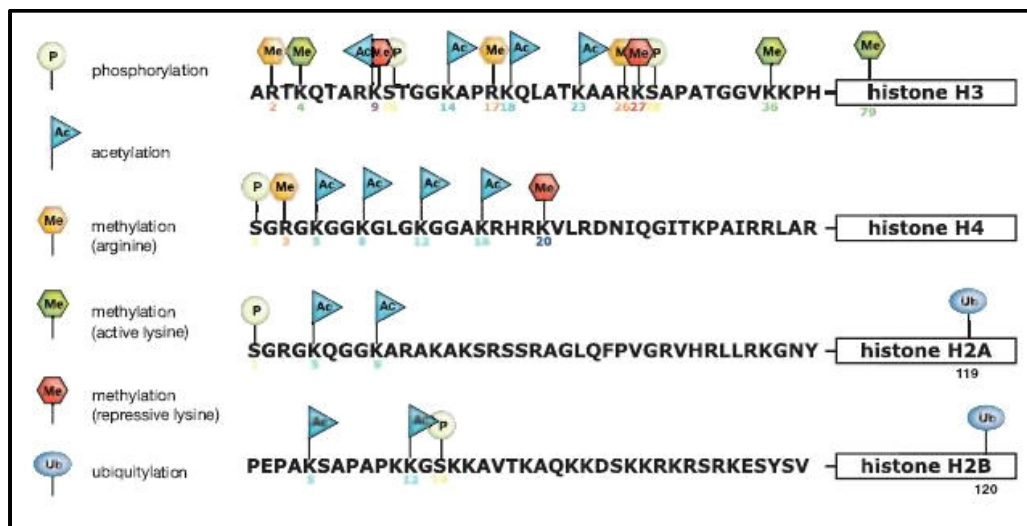
#### 1.1.3.2.2 Modificación de histonas

Las modificaciones de histonas representan el sistema de regulación epigenética que muestra el rango más amplio de variaciones, agrupando más de 50 sitios conocidos de modificación <sup>74</sup>. Las histonas se empaquetan formando un octámero alrededor del cual se enrolla el ADN (**Figura 7**), y sus colas están sujetas a varias formas de modificación post-traducciona, entre las que se incluyen metilación, citrulinación, acetilación, fosforilación, SUMOilización y ADP-ribosilación (**Figura 8**) <sup>75</sup>. Estas

modificaciones tienen como consecuencia biológica actuar como marcadores para la unión de complejos proteicos reguladores que afectan a la estructura del nucleosoma, constituyendo lo que se ha denominado un “código de histonas”<sup>76</sup>.



**Figura 7: Representación del nucleosoma:** donde se muestran la posición de los aminoácidos susceptibles de ser modificados.



**Figura 8: Representación de los aminoácidos modificables en cada histona y el tipo de la misma.**

Aunque la posible interacción que puedan jugar las distintas modificaciones en las histonas continúa siendo bastante desconocida, un paradigma está emergiendo

rápidamente según el cual metilación, acetilación o fosforilación en sitios independientes podrían estar actuando conjuntamente para producir una misma respuesta biológica <sup>77</sup>. Esta cooperación ya ha sido demostrada entre acetilación y fosforilación de la histona H3 durante el ciclo celular <sup>78</sup>, y la competencia entre metilación y acetilación de la lisina 9 de la histona H3 en el establecimiento o disrupción de la heterocromatina <sup>79</sup>.

Desde que en 1964 Allfrey advirtiera una correlación entre un incremento de la acetilación de histonas y el aumento de la transcripción <sup>80</sup>, mucho se ha descubierto sobre la relación entre acetilación, replicación, reparación y estructura de la cromatina <sup>81</sup>. La hiperacetilación de las lisinas de las histonas disminuye su carga positiva, reduciendo por tanto su afinidad por la carga negativa del ADN, y permitiendo el acceso de los factores transcripcionales a las regiones promotoras de los genes <sup>82</sup>. Inversamente, la desacetilación se cree que dificulta la accesibilidad al ADN al restaurar la carga positiva <sup>83</sup>. Además se ha observado que la acetilación de la región amino terminal de las histonas situadas cerca de los promotores génicos sirven de anclaje a los complejos iniciadores de la transcripción <sup>84</sup>. En cuanto a la duración de estas modificaciones, parece ser que la acetilación de las histonas es un fenómeno efímero, sin embargo la metilación confiere una memoria epigenética a largo plazo <sup>85</sup>. Muchas evidencias sugieren que la metilación de lisinas juega un papel crítico en fenómenos como la regulación transcripcional, la inactivación del cromosoma X, la metilación del ADN y la formación de heterocromatina <sup>86</sup>.

Dentro de la histona H3 se encuentran muchas de las lisinas metiladas por las metiltransferasas. La metilación de las lisinas 9 y 27 se correlacionan con un silenciamiento de la expresión, mientras que la metilación de las lisinas 4, 36 y 79 se relacionan con genes activos transcripcionalmente <sup>87</sup>.

#### 1.1.4 Los genes reparadores *hMLH1* y *hMSH2*

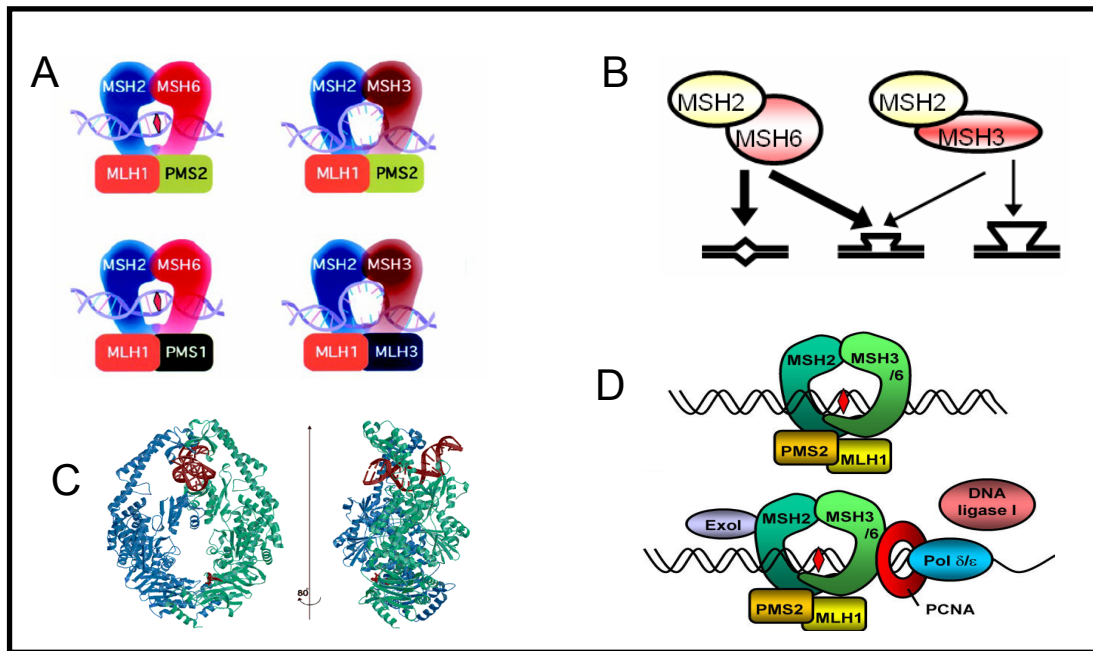
La primera evidencia que indicó que este sistema de reparación podía estar implicado en cáncer proviene de estudios realizados en casos esporádicos de cáncer colorrectal, en los que se detectaron numerosas alteraciones en secuencias microsatélites<sup>49,88</sup>. Posteriormente se confirmó que esta MSI era común en pacientes de HNPCC<sup>50</sup>. Sin embargo no fue hasta los trabajos de Strand realizados en bacterias cuando se relacionó la presencia de MSI con un posible defecto en la maquinaria reparadora<sup>89</sup>.

La implicación de estos genes en el desarrollo tumoral se produce de forma indirecta, puesto que no están implicados en el control de la división y proliferación celular. Sin embargo un defecto en los mismos puede provocar un aumento en la tasa de inestabilidad genómica de hasta 1000 veces<sup>90</sup>, concentrándose la misma en secuencias microsatélite. Por esta razón, la presencia de un microsatélite en la región codificante de un gen hace que éste tenga una mayor susceptibilidad a sufrir mutaciones.

Se conocen varios genes implicados en reparación post-replicativa del ADN (*mismatch repair genes* o MMR): *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1* y *PMS2*<sup>91</sup>. Entre éstos, la mayoría de las mutaciones se concentran en *MLH1* y *MSH2*<sup>92,93</sup>, y como consecuencia se pierde la capacidad de la célula para corregir los errores producidos en la replicación del ADN.

En bacterias se conocen 2 complejos encargados de la reparación, denominados MutS y MutL, que están compuestos cada uno de ellos por la dimerización de una misma proteína formando un homodímero<sup>94</sup>. La función del complejo MutS es el

reconocimiento de desapareamientos en la secuencia de ADN, mientras que el complejo MutL sirve de anclaje entre el complejo MutS y el resto de la maquinaria reparadora. En humanos los complejos no están formados por homodímeros, sino por heterodímeros (**Figura 9-A**), esto quiere decir que cada complejo está compuesto por la unión de 2 proteínas diferentes. A la hora de su nomenclatura los homólogos humanos de estos genes se nombran anteponiendo la letra “h” al nombre del gen y también al del complejo. Del complejo hMutS pueden encontrarse en humanos 2 variantes, hMutS $\alpha$ , formado por la unión de hMSH2-hMSH6, y hMutS $\beta$  formado por la unión de hMSH2-hMSH3. De éstos el que aparece de forma mayoritaria es hMutS $\alpha$ , y su función es el reconocimiento de desapareamientos de 1 ó 2 nucleótidos de extensión<sup>95,96</sup>. Por otro lado el complejo hMutS $\beta$  reconoce errores que afectan a un número de bases mayor (**Figura 9-B**). Estos complejos hMutS rodean el ADN como un anillo y lo recorren en busca de un mal apareamiento (**Figura 9-C**). Una vez detectado el error por parte del complejo hMutS se le une el complejo hMutL, formado por los heterodímeros hMLH1-hPMS2 o hMLH1-hPMS1 y posteriormente el resto de maquinaria reparadora, encargada de cortar y eliminar la cadena errónea, y posteriormente resintetizarla correctamente<sup>97</sup> (**Figura 9-D**).



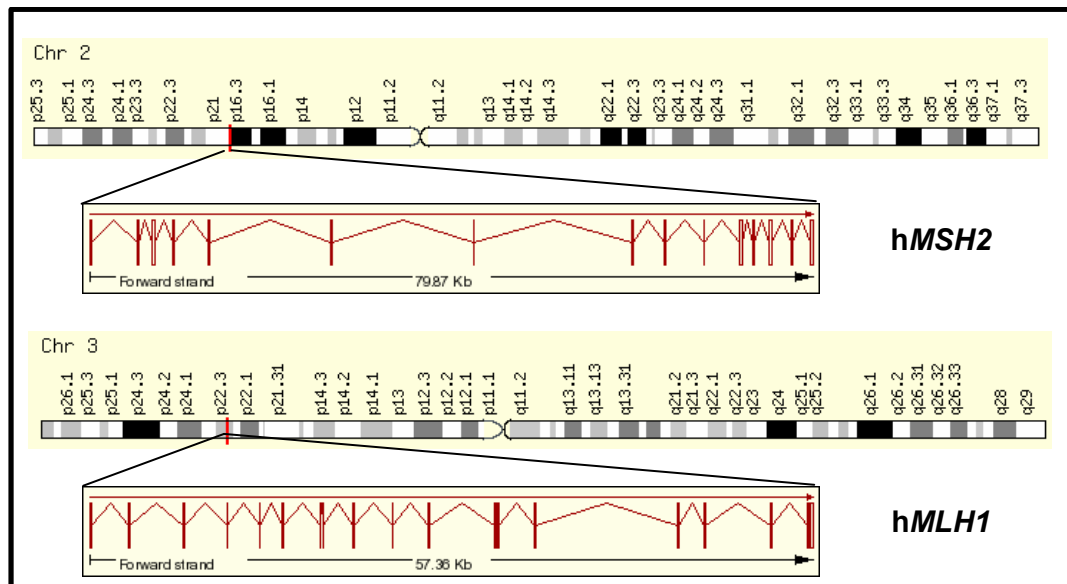
**Figura 9: Estructura de los complejos MMR:** A) Diferentes complejos de proteínas MMR capaces de reconocer apareamientos erróneos en el ADN. B) Cada complejo que rodea el ADN reconoce errores de un determinado tamaño. El grosor de la flecha es indicativo de la preferencia de cada complejo por los errores según sus tamaños C) Modelo del complejo de hMSH2-hMSH6 rodeando la fibra de ADN. D) Reconocimiento de error y unión al resto de maquinaria reparadora que elimina el fragmento erróneo y resintetiza la hebra.

De todos los genes MMR son *hMLH1* y *hMSH2* los que concentran la mayoría de las mutaciones conocidas que provocan inestabilidad de microsatélites. Una posible explicación puede deberse a que tanto en el complejo hMutS como hMutL la función realizada por las proteínas hMSH2 y hMLH1 respectivamente no puede ser suplida por otra. Sin embargo, mutaciones en las proteínas MMR que sirven de pareja a hMLH1 (hPMS1 y hPMS2) y hMSH2 (hMSH3 y hMSH6) no son tan nocivas porque no se pierde totalmente la capacidad de corrección, tan solo la de algún tipo concreto de error. Además existe cierta redundancia funcional entre proteínas como MSH3 y MSH6, siendo el efecto de una doble mutación en los genes *hMSH3* y *hMSH6* similar al de una mutación en el gen *hMSH2* puesto que se pierde totalmente la capacidad de reconocer los errores<sup>98</sup>. Se ha demostrado que la capacidad de reconocer el error reside en la subunidad hMSH6 del heterodímero<sup>99</sup>, una vez reconocido el error se une el

heterodímero hMLH1-hPMS2 el cual es el más activo en humanos<sup>100</sup>, y recluta al resto de maquinaria reparadora.

En cuanto a otros complejos como hMLH1-hPMS1 y hMLH1-hMLH3 todavía no se conoce exactamente cual puede ser su implicación en tipos tumorales que cursen con presencia de MSI.<sup>101</sup> Se ha demostrado que tienen funciones redundantes, y por tanto mutaciones en *hPMS1* y *hMLH3* presentan una baja penetrancia<sup>102</sup>. Además la expresión de hPMS1 es 10 veces menor que la de hPMS2, y aunque se une eficientemente a hMLH1, no consigue realizar la misma función que el complejo formado por hMLH1-hPMS2<sup>103</sup>.

El gen *hMLH1* se localiza en el brazo corto del cromosoma 3 en la posición 3p22, esta formado por 19 exones y codifica una proteína de 756 aminoácidos.. El gen *hMSH2* se localiza en el brazo corto del cromosoma 2 en la posición 2p21, está formado por 16 exones y codifica 934 aminoácidos, y (**Figura 10**).



**Figura 10. Localización cromosómica de los genes *hMSH2* y *hMLH1* en los cromosomas 2 y 3 respectivamente. También se muestran la estructura de los exones y la extensión de los mismos.**

#### **1.1.4.1 El Síndrome de Lynch**

La enfermedad originada por mutaciones en los genes MMR se denomina Síndrome de Lynch, o cáncer colorrectal hereditario no polipoideo (HNPCC), pues ésta última es la manifestación más común de dicho síndrome <sup>104</sup>. Está provocado por la acumulación de errores producidos en secuencias microsátélites durante la replicación, como consecuencia de la disfunción de la actividad reparadora de los genes MMR, estimándose dicha acumulación de mutaciones en torno a  $10^5$  en un tumor <sup>49</sup>. Las principales características del Síndrome de Lynch son: patrón de herencia autosómico dominante, penetrancia del 90% y edad media para el desarrollo de cáncer de colon de 45 años <sup>105</sup>. Suele provocar la aparición de varios tumores colorrectales, tanto sincrónicos como metacrónicos, y riesgo elevado de sufrir otros tipos tumorales extracolónicos, especialmente endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, páncreas, uréter y pelvis renal <sup>2</sup>, caracterizados todos ellos por la presencia de MSI<sup>50,51</sup>.

En tumores hereditarios con MSI, la principal forma de inactivación de los genes MMR es por mutación, sin embargo en tumores esporádicos con MSI la forma más común de inactivación es mediante la metilación del promotor del gen *hMLH1*. Este fenómeno se ha evidenciado en cáncer colorrectal <sup>106</sup>, cáncer endometrial <sup>107</sup> y de estómago <sup>108</sup>, sin embargo en otros genes reparadores como *hMSH2*, *hMSH6* y *hMSH3* no se ha observado presencia de hipermetilación. <sup>109-111</sup>. Se estima que entorno al 15% de los cánceres colorrectales podrían estar causados por defectos en los genes reparadores: la mayoría de los HNPCC, que suponen un 5% del total, así como un 10% de los de origen esporádico. El 85% restante seguirían la ruta supresora, caracterizada por la presencia de inestabilidad de tipo cromosómico.



Para evaluar el grado de MSI y unificar criterios se eligieron una serie de microsatélites consenso conocidos como microsatélites de Bethesda<sup>112</sup>. Estos cinco microsatélites son BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S345 y D17S250. De acuerdo con los criterios internacionales se suele dividir la MSI en alta inestabilidad (MSI-High) cuando dos o más de estos microsatélites presentan inestabilidad, o baja (MSI-Low) si el número es menor de dos<sup>113</sup>. Como diagnóstico del HNPCC se crearon una serie de criterios, cuya última revisión se realizó en 2004<sup>113</sup>, y son los siguientes:

- Cáncer colorrectal diagnosticado en pacientes antes de los 50 años.
- Independientemente de la edad del individuo, que exista la presencia de cáncer colorrectal sincrónico o metacrónico u otros tumores asociados a HNPCC.
- Cáncer colorrectal con MSI-H diagnosticado histológicamente antes de los 50 años.
- Cáncer colorrectal diagnosticado en uno o varios familiares de primer grado afectado de HNPCC o tumores relacionados y que fueron diagnosticados antes de los 50 años de edad.
- Cáncer colorrectal diagnosticado en dos o más familiares de primer o segundo grado independientemente de la edad.

## **1.2 INTRODUCCIÓN AL CÁNCER RENAL**

### **1.2.1 Epidemiología**

Los tumores renales malignos suponen el 2-3% de las neoplasias del adulto, ocupando el carcinoma de células renales (CCR) el 80-85% de todos ellos. Es el tercer tumor más frecuente del aparato genitourinario, solamente precedido de los tumores de próstata y vejiga, y ocupa la décima posición en frecuencia de todas las neoplasias en el varón y la decimocuarta en la mujer <sup>114,115</sup>.

En España, el carcinoma renal representa el 2,9% de los tumores del varón y el 1,7% en la mujer. Se diagnostican alrededor de 2000 nuevos casos anuales, con una incidencia de 4,1 a 4,5 cada 100.000 habitantes/año <sup>114</sup>. La incidencia del CCR ha ido aumentando en los últimos 30 años, siendo el diagnóstico incidental la causa fundamental de este incremento por el mejor uso de técnicas de imagen.

El CCR es de 1,6 a 2 veces más frecuente en el sexo masculino, apareciendo fundamentalmente a partir de los 50 años, con un pico máximo de incidencia en la sexta década de la vida. Por debajo de esta edad su incidencia es rara, de manera que menos del 4% de los tumores renales aparecen por debajo de los 40 años <sup>116</sup>. En los niños es poco frecuente representando el 2% de las neoplasias infantiles <sup>114,117</sup>.

En España la tasa de mortalidad varía según sexo de 1,1-2,8 por 100.000 y es responsable de 800 fallecimientos anuales <sup>118</sup>. A pesar de todas estas circunstancias, el pronóstico de los pacientes diagnosticados de CCR ha mejorado en los últimos años, variando la tasa de supervivencia relativa a los 5 años de un 36-39% en los años sesenta hasta un 50-60% a finales de los ochenta <sup>117</sup>.

Aunque no parece haber un factor relevantemente importante de riesgo de desarrollo de CCR, hay estudios que relacionan un aumento de incidencia entre fumadores <sup>116</sup>, en personas obesas, <sup>119,120</sup> en dietas con elevado aporte calórico <sup>121,122</sup> y bajo aporte de minerales y vitamina E <sup>121</sup>. En cuanto a factores ocupacionales se ha descrito un aumento de riesgo en trabajadores expuestos a asbesto, cadmio y plomo en la industria metalúrgica, así como a los expuestos a hidrocarburos y derivados del petróleo.

### 1.2.2. Biología molecular del CCR

Los CCR constituyen un grupo heterogéneo de tumores que aparecen tanto de forma esporádica como de forma hereditaria. El 85% de las formas esporádicas corresponden al tipo histológico de células claras, el 5-10% son carcinomas papilares y el resto son tipos histológicos extraños como los carcinomas cromófobos o los carcinomas de túbulos colectores.

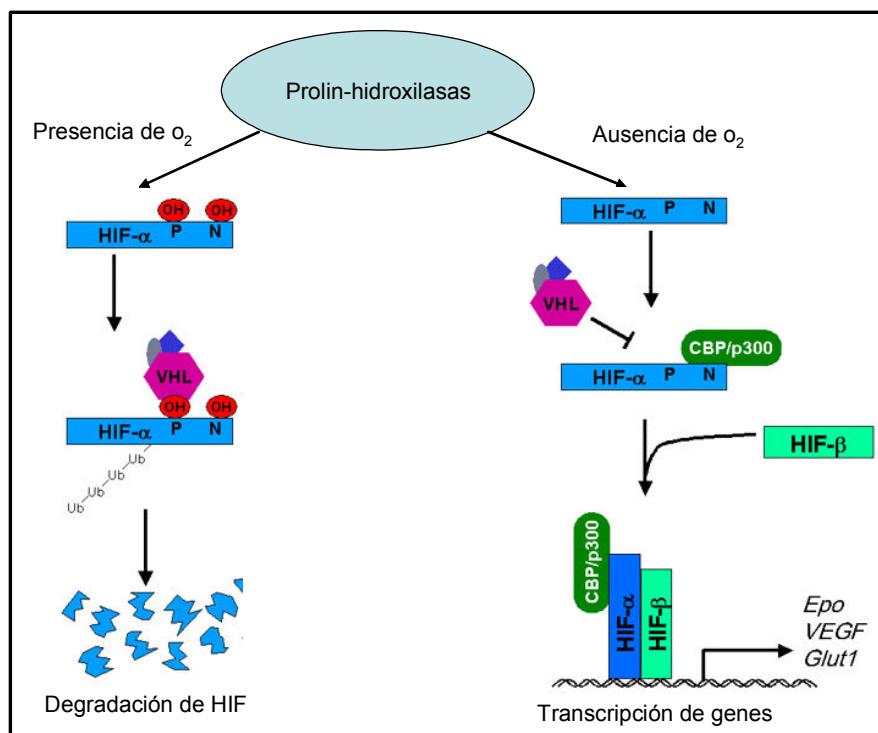
Los casos hereditarios representan aproximadamente el 4% de los CCR, y en la actualidad se admiten 3 formas de cáncer renal hereditario:

- 1) Carcinoma renal hereditario de células claras (HCRC).
- 2) Carcinoma renal asociado al Síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL).
- 3) Carcinoma renal hereditario papilar (HPRC).

Desde el punto de vista citogenético la principal alteración detectada en los tumores de células claras esporádicos es la pérdida del brazo corto del cromosoma 3 <sup>123</sup>, situándose el 90% de ellas en la región comprendida entre 3p12-3p25 <sup>124</sup>. En esta región se localiza el gen supresor *VHL* cuya mutación origina el síndrome conocido

como Von Hippel-Lindau. Los individuos afectados por esta enfermedad presentan riesgos mayores de padecer tumores en diferentes órganos, incluyendo riñones, cerebelo, espina dorsal, oído interno y glándulas adrenales<sup>125</sup>. El gen *VHL* no sólo aparece mutado en los casos hereditarios, sino que también lo hace en los casos esporádicos, con una frecuencia superior al 80 % en los tumores de célula clara <sup>126</sup>.

Bioquímicamente la principal función de la proteína VHL es controlar la degradación del factor inducible por hipoxia HIF. En presencia de oxígeno, las enzimas denominadas prolin-hidroxilasas específicas de HIF hidroxilan a este factor transcripcional <sup>127</sup>, el cual una vez hidroxilado es reconocido por la proteína VHL que lo marca por ubiquitinación para su posterior degradación vía proteosoma <sup>128</sup>.



**Figura 11: Representación de la ruta bioquímica del factor *HIF-1 $\alpha$* , el cual es hidroxilado por las prolin-hidroxilasas en presencia de oxígeno, estado en el cual es reconocido por la proteína VHL que lo poliubiquitina quedando de esta forma marcado para su degradación.**

El factor HIF regula la expresión de hasta 60 genes de respuesta a hipoxia, que favorecen la supervivencia celular y la angiogénesis en condiciones de carencia de oxígeno <sup>129</sup>, y es detectable en muchos tumores, mientras que no lo es en tejido normal <sup>130</sup>. La presencia de HIF es necesaria en la progresión tumoral, puesto que uno de los requisitos necesarios para que el tumor consiga crecer es que exista una importante neovascularización que provea de oxígeno y nutrientes. Además VHL podría tener un papel en el mantenimiento de la matriz extracelular <sup>131</sup> y control de la movilidad celular <sup>132</sup>. En la misma línea otros estudios demuestran que la ausencia de VHL se traduce en una pérdida de E-cadherina <sup>133</sup>, proteína necesaria para la correcta adhesión celular, y cuya ausencia podría jugar un papel decisivo en fenómenos como la migración celular y metástasis <sup>134</sup>.

### **1.2.3 Anatomía patológica**

#### **1.2.3.1 CCR de células claras:**

A este tipo tumoral corresponden más del 80% de todas las neoplasias renales del adulto. Se considera que su origen se encuentra en el túbulo proximal de la nefrona. Macroscópicamente son tumores grandes, con un diámetro medio de 8 cm. y con cierta frecuencia son múltiples, sobre todo cuando aparecen asociados a una enfermedad quística adquirida (pacientes dializados) y a la enfermedad de Von Hippel-Lindau. Histológicamente está formado por células grandes, columnares, cuboideas o poligonales. Los límites celulares son nítidos y el citoplasma claro, casi transparente. Los núcleos son centrales, y su tamaño y forma varían dependiendo del grado tumoral.

Las células se disponen siguiendo un patrón sólido, trabecular o alveolar, rodeadas por una fina red de capilares.

### **1.2.3.2 CCR papilar**

Es el segundo en frecuencia y supone un 10-15% de los CCR. La característica histológica fundamental de este tipo de tumores es su arquitectura papilar, formada por ejes centrales conectivo-vasculares rodeados por células epiteliales neoplásicas <sup>135</sup>. Estas células tienen un citoplasma granular eosinófilo o basófilo, por lo que también se ha denominado carcinoma cromófilo <sup>136</sup>. Desde el punto de vista citogenético presenta trisomía de los cromosomas 7 y 17, y pérdida del cromosoma Y. Otros cromosomas que pueden estar implicados son el 3q, 12, 16 y 20.

### **1.2.3.3 CCR cromófofobo**

Ocupa el tercer lugar en frecuencia de aparición de los tumores malignos epiteliales de riñón y representa alrededor del 5% de todos los CCR <sup>135</sup>. Normalmente presentan pérdidas en los cromosomas 1, 2, 6, 10, 13, 17 y 21 <sup>137,138</sup>.

Estos tumores tienen unas particularidades morfológicas, histoquímicas y ultraestructurales diferentes al resto de los CCR. Seguramente por su origen distinto, ya que derivan de la porción cortical de los ductos colectores <sup>139</sup>. Se describen dos variantes de este subtipo histológico:

**-Variante clásica:** Compuesta por células de gran tamaño, redondeadas o poligonales, que adoptan habitualmente un patrón sólido, aunque puede ser trabecular, tubular o quístico. Con frecuencia presenta células binucleadas.

**-Variante eosinófila:** Presenta células más pequeñas con abundante citoplasma granular intensamente eosinófilo, positivo para hierro coloidal con la tinción de Hale y con abundantes microvesículas.

#### **1.2.3.4 Carcinoma de los ductos colectores**

También llamado carcinoma de los ductos de Bellini, constituye menos del 1% de los CCR. Pueden formar papilas, túbulos o ductos revestidos por células de citoplasma finamente granular con núcleos atípicos y nucleolos prominentes. La caracterización genética es difícil, ya que la pequeña incidencia de estos tumores hace que haya pocos estudios. Se han descrito pérdidas de material genético en los cromosomas 1, 6, 8p, 14, 15 y 22<sup>140,141</sup>.

#### **1.2.3.5 Carcinoma sarcomatoide**

El carcinoma sarcomatoide no es un subtipo de CCR propiamente dicho, sino que esta denominación se reserva para aquellos tumores que presumiblemente tienen un origen determinado y que han sufrido una transformación maligna, pobremente diferenciada, pero no son primitivamente sarcomatosos. Esta diferenciación sarcomatoide ocurre en 1-4% de los CCR, pero la variante histológica que más frecuentemente la sufre es el CCR de células claras<sup>135</sup>.

Son tumores con un elevado grado de atipia nuclear, importante presencia de necrosis intratumoral y mayor frecuencia de invasión microvascular, aspectos que les confieren un mal pronóstico.

### **1.2.3.6 Carcinoma de células renales inclasificado**

En esta categoría se engloban aquellos tumores que no se pueden catalogar en ninguna de las descritas anteriormente, bien por su diferenciación sarcomatoide o bien porque su patrón arquitectural no responde a las características de los otros subtipos. También se incluyen en este apartado los tumores productores de mucina, los que tienen mezcla de elementos estromales y epiteliales, y los de tipos celulares irreconocibles.

## **1.2.4 Factores pronósticos**

### **1.2.4.1 Grado nuclear**

El grado nuclear es un parámetro que cataloga las distintas características de los núcleos celulares y que se ha intentado poner en relación con el pronóstico de los pacientes con CCR. Han sido propuestas numerosas clasificaciones para el grado nuclear, siendo el sistema propuesto por Fuhrman el más utilizado hoy en día. No obstante, este sistema también tiene sus limitaciones, y está sujeto a controversia <sup>142</sup> (Tabla 1).

El establecimiento del grado nuclear es un método que se sirve de la subjetividad, por lo que existe una elevada variabilidad inter-observador que hace que no sea del todo satisfactorio. Además la clasificación en cuatro categorías lo hace especialmente tedioso para el patólogo. No se han encontrado diferencias pronósticas entre los grados 1 y 2, por lo que se ha propuesto la posibilidad de transformar este sistema en uno de tres categorías. Cuando coexisten dos o más grados, no se ha



establecido la cantidad de células con grado superior para catalogar el tumor en la categoría de mayor grado. Tampoco ha quedado claro si deben graduarse todos los subtipos histológicos.

**Tabla 1:** Descripción de los distintos grados celulares de Fuhrman

grado	Tamaño nuclear	Contorno nuclear	nucleolo
1	10µm	Redondeado y uniforme	Ausente o no prominente
2	15µm	Irregular	Pequeño
3	20µm	Irregular	Prominente
4	≥20µm	Multilobulado, bizarro	Prominente con grumos de cromatina gruesos

#### 1.2.4.2 Estadío tumoral

Aunque el sistema de clasificación clásico descrito por Robson <sup>143</sup> tiene todavía hoy vigencia, la clasificación más utilizada actualmente en la estadificación tumoral es la del sistema TNM (**Tabla 2**), cuya última revisión se produjo en el año 1997 <sup>144</sup>.

Después del tipo histológico, la estadificación tumoral es el factor pronóstico más importante en cuanto a supervivencia <sup>145</sup>. Con la nueva revisión del sistema TNM, el tamaño tumoral juega un papel muy importante, ya que las dos primeras categorías T (T1 y T2) sólo tienen en cuenta este parámetro y el límite de 7 cm entre un estadio y otro es para algunos autores excesivo, dado que el tamaño tumoral tiene por sí solo un valor pronóstico <sup>146,147</sup>.

La invasión tumoral de la vena renal, vena cava, pelvis renal y grasa perirrenal son todavía objeto de discusión. No está claro que la invasión en la vena renal produzca una disminución de la supervivencia, ni tampoco la invasión de la vena cava. No parece haber diferencias en términos de supervivencia para los sub-estadios patológicos de pT3 <sup>146,147</sup>. No ocurre lo mismo con la invasión tumoral de los ganglios linfáticos y la

presencia de metástasis, que son factores decisivos en el pronóstico de los pacientes con CCR<sup>145,147</sup>.

**Tabla 2: Clasificación TNM de los tumores renales**

### **T- Tumor primario**

- Tx** No se puede evaluar el tumor primario  
**T0** No hay evidencia de tumor primario  
**T1** Tumor de diámetro máximo menor o igual a 7 cm, limitado al riñón  
**T1a.-** Tumor  $\leq 4$  cm  
**T1b.-** Tumor  $> 4$  cm y  $< 7$  cm  
**T2** Tumor de diámetro máximo mayor a 7 cm, limitado al riñón  
**T3** Tumor que se extiende a las venas principales o invade la glándula suprarrenal o los tejidos perirrenales, pero sin atravesar la fascia de Gerota.  
**T3a.-** Invade glándula suprarrenal o tejidos perirrenales, sin atravesar la fascia de Gerota  
**T3b.-** Se extiende a las venas renal o cava por debajo del diafragma  
**T3c.-** Se extiende a la vena cava por encima del diafragma  
**T4** Tumor que atraviesa la fascia de Gerota

### **N- Ganglios linfáticos regionales**

- Nx** No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales  
**N0** No se demuestran metástasis ganglionares regionales  
**N1** Metástasis en un único ganglio linfático regional  
**N2** Metástasis en más de un ganglio linfático regional

### **M- Metástasis a distancia**

- Mx** No se pueden evaluar las metástasis a distancia  
**M0** No hay metástasis a distancia  
**M1** Metástasis a distancia

<b>Estadio I</b>	T1 N0 M0
<b>Estadio II</b>	T2 N0 M0
<b>Estadio III</b>	T3a, N0 M0
	T3b, N0 M0
	T3c N0 M0
	T3a N1 M0
	T3b N1 M0
	T3c N1 M0
<b>Estadio IV</b>	T4 N0, N1 M0, Cualquier T N2 M0, Cualquier T Cualquier N M1

### **1.2.4.3 Otros factores pronósticos**

Pese a que el estadio y el grado tumoral son los dos factores pronósticos más importantes para predecir la supervivencia en los pacientes sometidos a nefrectomía radical, algunos pacientes con el mismo estadio y grado muestran variaciones significativas en el curso de la enfermedad. Por ello se ha tratado de utilizar otros factores pronósticos como:

**-Tipo celular:** Generalmente los tumores bien diferenciados formados por células claras o células granulares tienen mejor pronóstico que los tumores mixtos o los que tienen células fusiformes o anaplásicas.

**-Patrones histológicos:** El CCR puede crecer según varios patrones histológicos: sólido, tubular, quístico, papilar. Puesto que los estudios realizados parecen ser contradictorios, en la actualidad no se puede considerar el patrón de crecimiento histológico como un factor con significación pronóstico.

**-Morfometría nuclear:** Los diversos parámetros nucleares que pueden analizarse son área, perímetro, diámetro mayor, forma, tamaño, factor de elongación, factor de regularidad y área nucleolar. La laboriosidad de la técnica y su influencia por diversas fuentes de error, como la falta de uniformidad en el procesamiento del tejido y la propia técnica de medida son los mayores inconvenientes de esta metodología.

### 1.2.5 Historia natural y tratamiento del adenocarcinoma renal

Una de las características que definen la historia natural del CCR es la gran variabilidad de su comportamiento. Puede presentarse de diversas formas, y la triada típica descrita por Guyon, compuesta por dolor, masa en flanco y hematuria, es bastante infrecuente, presentándose en menos del 10% de los casos. Esto hace que hoy en día la forma de diagnóstico más habitual sea la incidental, y en caso de que exista clínica, la hematuria es el síntoma más frecuente <sup>148</sup>.

La capacidad de metastatización de estos tumores es independiente del tamaño tumoral, son neoplasias que tienen tendencia a la multifocalidad o presencia de nódulos satélites <sup>149</sup> y la capacidad de progresión y de recurrencia es imprevisible, ya que se han descrito recidivas tardías e incluso regresiones espontáneas de lesiones metastásicas. En resumen, la presencia de metástasis es frecuente, llegando hasta un 30% al diagnóstico, pudiendo aparecer éstas en sitios inusuales <sup>150</sup>.

La nefrectomía radical es considerada el tratamiento de elección en el cáncer renal. Robson demostró un aumento de supervivencia en pacientes con CCR tratados con esta técnica frente a aquellos tratados con nefrectomía simple <sup>143</sup>. En los últimos años, la proporción de pacientes sometidos a cirugía como tratamiento único en pacientes con CCR en estadios I, II ó III aumentó ligeramente, mientras que dicho procedimiento como única opción terapéutica disminuyó cuando se trataba de tumores en estadio IV <sup>151</sup>.

La nefrectomía parcial se ha introducido, en los últimos años, como una técnica alternativa a la cirugía radical, que en casos seleccionados y con riñón contralateral sano, obtiene resultados similares a los conseguidos con la nefrectomía radical <sup>152</sup>.

En un estudio, la supervivencia relativa a los 5 años para pacientes tratados quirúrgicamente, fue del 87% para estadios I y II, del 63,6% en estadio III y del 21,9% en estadio IV<sup>151</sup>. Otras formas de tratamiento obtuvieron tasas de supervivencia pobres en comparación con la cirugía (considerando en este caso sólo tumores en estadio IV). La supervivencia fue significativamente mayor en pacientes menores de 50 años que en aquellos de edad superior <sup>151</sup>.

El CCR es uno de los tumores con menos respuesta al tratamiento quimioterápico. Tampoco las radiaciones o la hormonoterapia han sido efectivas hasta el momento y la única terapia adyuvante a la cirugía parece ser la inmunoterapia, la cual todavía no se ha establecido como tratamiento eficaz, pero parece tener cierta utilidad, quedando como una alternativa prometedora <sup>153,154</sup>.

La inmunoterapia se basa en la modulación de la respuesta biológica que se establece entre el tumor y el huésped, en especial con su sistema inmune. Se usa fundamentalmente para el tratamiento del cáncer renal metastásico. Las moléculas que más utilidad han demostrado en este sentido son el interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) y la interleuquina-2 (IL-2)<sup>145</sup>. El IFN- $\alpha$  posee actividad antiviral y también anticancerosa. Las características inmunorreguladoras de esta molécula incluyen la activación de macrófagos y monocitos; incremento de la actividad de las células citotóxicas *natural killer* (NK); inducción de la expresión antígeno-específica en la superficie celular y aumento de la actividad de los linfocitos T citotóxicos. Como sustancia antineoplásica como tal, las funciones del IFN- $\alpha$  no están claramente establecidas, pero incluyen la inhibición de la síntesis proteica, el aumento de la respuesta inmunológica y efectos directos en la regulación génica <sup>153</sup>.

Por otro lado, la IL-2 supone otro inmunorregulador con actividad antineoplásica demostrada en el cáncer renal. Se trata de una glicoproteína producida

por los linfocitos T. Dentro de sus funciones reside la activación de las células NK, la regulación de la proliferación linfocitaria, la estimulación de células citotóxicas, la producción secundaria de citokinas y el incremento de los niveles de proteína C reactiva. El uso de IL-2 recombinante en el tratamiento del cáncer renal metastásico se basa en la capacidad de regulación de la misma sobre las poblaciones celulares que están involucradas en la respuesta antitumoral del sistema inmune <sup>153</sup>.

En los últimos años se están empezando a estudiar los inhibidores de la angiogénesis como tratamiento del CCR. Las vías de regulación de los procesos de angiogénesis están alteradas en la mayoría de los tumores renales. El factor de crecimiento vascular (VEGF) es el responsable de desencadenar la respuesta angiogénica y está regulado por el factor HIF y este a su vez por la proteína VHL, de forma que mutaciones en VHL se asocian a altos niveles de VEGF. Los tratamientos utilizados contra la ruta angiogénica regulada por el factor VEGF han sido:

**Bevacizumab:** Es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al factor VEGF bloqueando su acción. En un estudio realizado en 116 pacientes con CCR metastásico se observó un retraso en la progresión en los pacientes tratados que fue estadísticamente significativo <sup>155</sup>.

**Sunitinib:** Es un inhibidor de tirosin-quinasa que inhibe al receptor de VEGF (VEGFR-2), con lo que se consigue bloquear la cascada de señalización desencadenada por el factor VEGF. En un estudio realizado en 750 pacientes de CCR metastásico se observó un 31% de respuesta y un aumento de la supervivencia libre de progresión frente a otro grupo al que se suministró interferón <sup>156</sup>.

**Sorafenib:** Es otra molécula inhibidora de la actividad tirosin-kinasa que presentan receptores de factores transcripcionales como VEGFR-2 y PDGFR-B,

encargados de activar la respuesta angiogénica. Además también tiene actividad bloqueando a la ruta de RAS, la cual se activa por factores de crecimiento y promueve la división celular. Desde el punto de vista clínico se ha visto un aumento del tiempo de supervivencia libre de progresión en pacientes tratados con este fármaco <sup>157</sup>.

Queda mucho todavía por clarificar sobre el comportamiento y el tratamiento del CCR, en este apartado juega un papel importante el laboratorio, ya que la Biología Molecular y la Genética son los puntos hacia donde se encamina el futuro <sup>158</sup>.

## **II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Es sabido que existe una vía tumorigénica que implica a los genes reparadores de los errores de apareamientos erróneos (genes MMR). Cuando fracasa el sistema de corrección de estos errores se produce un incremento en la tasa de mutación de las células afectadas. Como consecuencia los tumores generados por defectos en los genes MMR presentan una característica fenotípica molecular llamada “inestabilidad de microsatélites” (MSI), que puede usarse como un indicador del estado funcional de la maquinaria reparadora. A los tumores que se asocian a esta alteración se les ha denominado “error de replicación positivo” (RER+, en terminología anglosajona) o cánceres con “fenotipo mutador”.

El primer proceso tumoral que se asoció a un defecto de esta vía reparadora del ADN fue el denominado cáncer colorrectal hereditario no polipoideo (HNPCC) o Síndrome de Lynch <sup>159,160</sup>, caracterizado por poseer una alta tasa de mutación en secuencias microsatélites. Se iniciaron entonces estudios con el objeto de caracterizar el estado funcional de los genes reparadores, encontrándose alteraciones sobre todo en los genes *hMSH2* y *hMLH1*, que son considerados como los principales genes reparadores de los errores de la replicación.

Los casos de HNPCC muestran una alta frecuencia de secuencias de microsatélites alteradas y un 90% se han podido determinar como RER+. Además, se ha podido establecer que entre el 10 y el 15% de los cánceres colorrectales considerados como esporádicos son RER+. Estos carcinomas comparten características clínicas con los HNPCC, de forma que los pacientes con cáncer colorrectal y “fenotipo mutador” parecen tener mejor pronóstico que los RER-. Asimismo, se ha observado que los pacientes con Síndrome de Lynch tienen un alto riesgo de padecer tumores extracolónicos, tales como uterinos, ováricos, gástricos o uroteliales, constituyendo lo

que se ha dado en llamar Síndrome de Lynch tipo II. En estos tumores extracolónicos ha sido descrita también la presencia de MSI <sup>161</sup>.

En relación con los tumores urológicos, se ha encontrado una asociación entre HNPCC y la aparición de tumores de células transicionales. Esta relación es más fuerte cuando se trata de tumores uroteliales que asientan en el tracto urinario superior, es decir: cálices, pelvis renal y uréter <sup>162</sup>.

La implicación de las alteraciones en genes reparadores ha sido escasamente documentada en los tumores de localización urológica, limitándose hasta el momento fundamentalmente a los tumores uroteliales, <sup>162-166</sup>. Al estudiar las características genéticas de estos tumores, se ha observado que la inestabilidad de microsatélites es bastante infrecuente en aquellos que asientan en la vejiga de la orina en relación a los que se localizan a nivel del tracto urinario superior, donde se ha podido constatar hasta un 46% de MSI en al menos 1 de los 5 microsatélites usados en el estudio <sup>167</sup>. Esto puede hacer pensar en la existencia de diferencias genéticas entre ambos tipos de tumores, aunque embriológicamente e histológicamente sean similares y estén formados por una misma estirpe celular. También se ha involucrado la existencia de MSI con una mayor tendencia a desarrollar tumores de urotelio superior con patrón de crecimiento invertido <sup>162</sup>. Finalmente se han descrito deficiencias en la expresión de las proteínas codificadas por los genes reparadores en los tumores uroteliales, ya sean de localización vesical, como de urotelio superior <sup>163</sup>, incluso se ha intentado dar valor pronóstico a la expresión de dichas proteínas, dado que aquellos tumores de estadio y/o grado superior presentan una pobre expresión de las proteínas reparadoras <sup>164</sup>.

En relación al cáncer renal, esta neoplasia supone aproximadamente el 3% de todos los tumores, siendo el carcinoma de células renales (CCR) la neoplasia maligna más frecuente en el riñón adulto. Su incidencia tiende a aumentar anualmente, aunque

este fenómeno se puede explicar en parte por el uso de técnicas diagnósticas más resolutivas tales como la ecografía, la TAC y la RMN,<sup>168</sup>. El tumor renal más frecuente es el carcinoma de células renales, que puede aparecer en el contexto de enfermedades hereditarias o de manera esporádica. La forma esporádica de estos tumores representa el 96% de los casos, de ahí el gran interés en conocer los mecanismos moleculares que inician la formación de estos tumores.

Las alteraciones genéticas asociadas al tumor renal parecen concretarse en torno al brazo corto del cromosoma 3 (3p), habiéndose descrito más de un 90% de alteraciones genéticas del 3p, en concreto en la región comprendida entre 3p12 y 3p25<sup>124</sup>. A nivel del *locus* 3p25-26 se encuentra el gen supresor *VHL* que se encuentra mutado en más de un 75-80% de pacientes con enfermedad de Von Hippel Lindau (responsable de la existencia de CCR de carácter familiar). Mutaciones en este gen se han visto también en aproximadamente un 50% de casos de CCR esporádico, aunque estudios previos de nuestro grupo encontraron porcentajes menores, siendo de un 22% en nuestro ámbito geográfico<sup>169,170</sup>.

Los estudios sobre microsatélites y alteraciones en los genes reparadores referentes al tumor renal son escasos y la mayoría de ellos hace referencia únicamente a la pérdida de heterocigosidad (LOH). En estos estudios se ha comprobado una incidencia muy variable de MSI en casos de CCR en función de los microsatélites analizados<sup>171</sup>. Incluso se ha intentado también determinar el valor clínico del análisis de microsatélites en plasma<sup>172</sup>, dándole valor pronóstico a la existencia de pérdida de heterocigosidad<sup>173</sup> e implicar el análisis de microsatelite en la clasificación histológica de los distintos subtipos de CCR<sup>174</sup>.

En enfermos con CCR esporádico se ha detectado mediante técnicas de inmunohistoquímica y de cuantificación de ARNm, que existe una disminución de la

expresión de los genes reparadores *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3* y *hMSH6*. Este descenso se ha podido correlacionar con la existencia de MSI y, en algunos casos, también se ha asociado con peores grados de diferenciación celular, no habiéndose establecido todavía asociación con el estadio tumoral <sup>175</sup>. Además, en estudios realizados sobre líneas celulares se ha observado la presencia de MSI ligada a mutaciones en el gen *hMLH1* <sup>176</sup>.

En definitiva, los hallazgos realizados hasta el momento sugieren que alteraciones en genes reparadores pueden estar asociados con el desarrollo del cáncer renal, aunque los estudios sobre las implicaciones de los genes MMR en el carcinoma renal son escasos y únicamente proporcionan, hasta el momento, una aproximación indirecta, basada fundamentalmente en análisis de microsatélites, estudios de inmunohistoquímica o de cuantificación de ARNm, la mayoría de ellos sobre líneas celulares de cáncer renal y no sobre pacientes. Además, tampoco se han establecido las posibles implicaciones pronósticas de las alteraciones de los genes MMR en pacientes con CCR. Esta situación, hace que sea necesaria realizar una evaluación más completa de las alteraciones en los genes *hMLH1* y *hMSH2* a partir de muestras de tejido tumoral. Por todo ellos, nos planteamos las siguientes hipótesis y objetivos:

## **2.1 HIPÓTESIS**

1) Las alteraciones en los genes reparadores *hMLH1* y *hMSH2* pueden jugar un papel importante en la génesis del carcinoma de células renales esporádico.

2) El estudio de análisis de microsatélites puede utilizarse como marcador en el diagnóstico y pronóstico de estos enfermos.

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 Principal

Analizar el estado funcional de los genes reparadores *hMLH1* y *hMSH2* en pacientes con carcinoma de células renales esporádico, usando cuatro aproximaciones metodológicas distintas.

1) Análisis de las variaciones de la secuencia de los genes *hMLH1* y *hMSH2* mediante secuenciación de nucleótidos en un grupo de 89 pacientes y 95 controles.

2) Detección del estado de metilación de la región promotora del gen *hMLH1* en ADN tumoral mediante la utilización de digestiones enzimáticas.

3) Determinación de la presencia de inestabilidad de microsatélites utilizando los descritos en el panel de Bethesda <sup>112</sup>, los microsatélites exónicos de los genes *TGF $\beta$ II*, *BAX* y el microsatélite D3S1611 situado próximo al gen *hMLH1*.

4) Valoración de la pérdida de heterocigosidad en los tumores estudiados.

### 2.2.2 Secundarios

1) Describir las características clínicas y anatomopatológicas de los pacientes.

2) Valorar la posible relación entre los datos moleculares y los factores pronósticos conocidos en el carcinoma de células renales esporádico.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se trata de un estudio descriptivo observacional, analítico y transversal sobre pacientes diagnosticados de carcinoma de riñón de células renales y tratados quirúrgicamente, siguiendo el protocolo aceptado y adoptado por la comunidad urológica internacional, bajo la aprobación del Comité de Ética del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Como grupo control se han incluido pacientes diagnosticados de patología urológica benigna y sin antecedentes conocidos de patología tumoral familiar.

### **3.2 SUJETOS DEL ESTUDIO**

El presente estudio se ha realizado revisando los datos clínicos e histológicos de 89 pacientes diagnosticados de carcinoma de células renales esporádico y tratados quirúrgicamente. Las muestras fueron recogidas de forma consecutiva durante el periodo comprendido entre mayo de 2002 y julio de 2006. Todos los sujetos fueron diagnosticados con la colaboración del Servicio de Anatomía Patológica, tratados y controlados por el personal facultativo del Servicio de Urología del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.

Los pacientes utilizados como controles fueron reclutados de forma consecutiva entre los enfermos que dieron su consentimiento informado y que iban a ser intervenidos por patología urológica benigna. En total este grupo lo formaron 95 sujetos.

### **3.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

Se incluyeron en el estudio pacientes sometidos a cirugía de exéresis de neoplasia renal, ya fuera radical o conservadora de parénquima renal, y en los que el diagnóstico anatomopatológico confirmó posteriormente la presencia de un carcinoma de células renales. Se desestimaron aquellos pacientes que tras la cirugía fueron diagnosticados de otra estirpe tumoral, ya fuera benigna o maligna, y los que presentaron historia de enfermedad familiar asociada a la aparición de tumores renales.

### **3.4 OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

Previo consentimiento informado, una vez realizada la cirugía se extrajo de la pieza operatoria y en fresco, muestras de tejido tumoral y tejido renal sano adyacente al tumor. A los 95 integrantes del grupo control, se les tomó una muestra de sangre para la realización del estudio. Una vez recogidas, las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

### **3.5 VARIABLES DEL ESTUDIO**

#### **3.5.1 Variables dependientes**

El estado de los genes reparadores *hMLH1* y *hMSH2* se valoró usando tres abordajes distintos, los cuales se complementan y permiten conocer de forma fiable el estado funcional de los mismos. Estos tres abordajes fueron: el análisis de la presencia de fenómenos de inestabilidad de secuencias microsatélite, el estudio de la presencia de

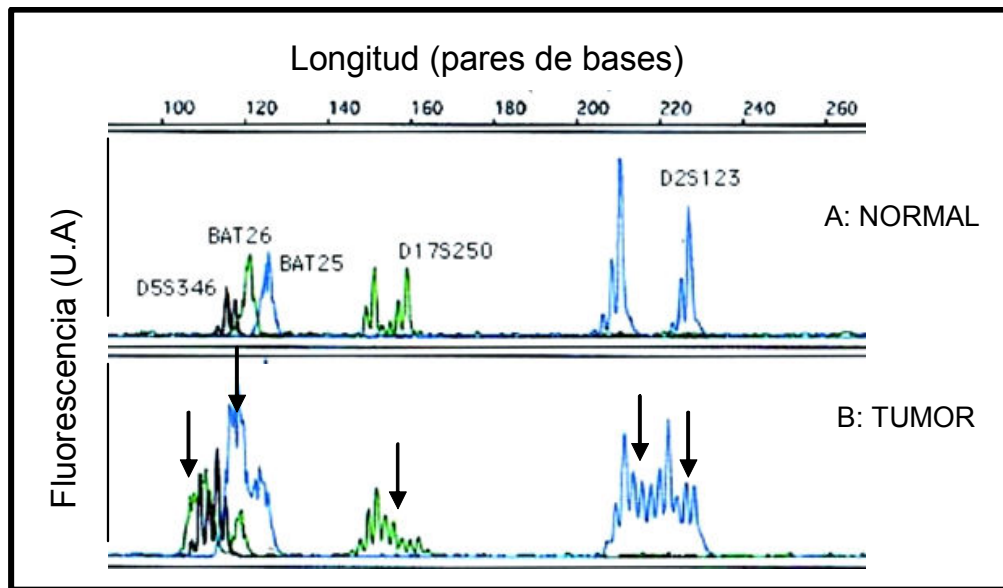


hipermetilación del promotor del gen *hMLH1*, y la existencia de alteraciones en la secuencia de nucleótidos de los genes *hMLH1* y *hMSH2*.

### 3.5.1.1 Análisis de secuencias microsatélite

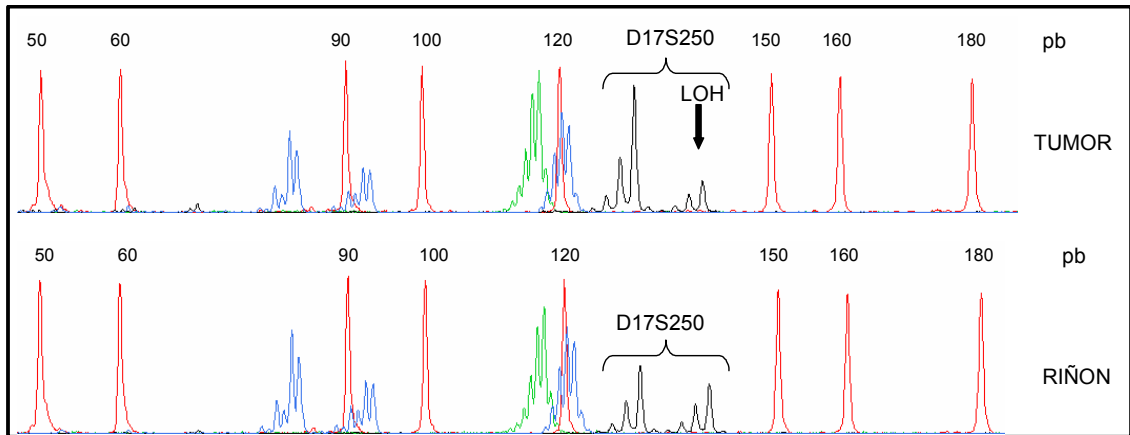
La inestabilidad en secuencias microsatélite (MSI) es consecuencia directa de una disfunción en la capacidad reparadora del ADN. Por tanto, la caracterización de estas secuencias permite valorar el estado funcional de los genes MMR. El estudio de MSI se basa en el análisis de la longitud de fragmentos de ADN correspondientes a distintas secuencias microsatélites, amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sometidos a electroforesis capilar empleando un secuenciador automático. Esta técnica requiere el marcaje de uno de los cebadores con un fluoróforo para poder detectar los fragmentos de ADN amplificados. Para estimar el tamaño de los productos de amplificación se incorpora un marcador de longitud a las muestras que queremos estudiar (marcador interno). Esta técnica permite detectar dos tipos de inestabilidad genómica:

**a) Inestabilidad de microsatélites (MSI):** En aquellos pacientes en los que se detecta una variación en la longitud de un microsatélite entre las muestras procedentes de tejido tumoral y normal. La aparición variaciones en la longitud de la secuencia microsatélite en ADN del tumor provoca que al analizarlas en el secuenciador dejemos de ver los grupos de picos discretos que observamos en ADN procedente de tejido sano. Estos microsatélites de longitud fija en el tejido sano han pasado a formar una población en las que encontramos secuencias con la longitud original, y otras en las que se ha perdido o ganado una, dos o mas repeticiones (**Figura 12**).



**Figura 12: Detección de MSI utilizando el panel de microsatélites de Bethesda.** A) Corresponde a un ADN estable procedente de tejido normal. B) Corresponde a un ADN con alta MSI procedente de un tumor. Las flechas indican la aparición de nuevos alelos en el ADN tumoral con longitud distinta a la original.

**2) Pérdida de heterocigosidad (LOH):** El fenómeno de LOH suele ser frecuente en tumores, y el estudio de secuencias microsatélite permite observar la pérdida de uno de los alelos respecto del tejido sano. Estas pérdidas pueden afectar a fragmentos grandes de ADN que contienen al microsatélite en su interior. Para poder observar tanto MSI como LOH es necesario comparar el ADN procedente del tumor con el precedente del tejido sano de un mismo individuo. En la **figura 13** se muestra una de las electroforesis realizadas con varios microsatélites donde se puede observar el fenómeno de LOH. En rojo se visualiza el patrón de pesos moleculares.



**Figura 13: Detección de LOH** Análisis de los microsatélites del panel de Bethesda en ADN tumoral y procedente de riñón sano de un mismo individuo. En el microsatélite D17S250 (color negro) se aprecia una bajada de la intensidad de fluorescencia (altura del pico) emitida por uno de los alelos en el tumor respecto al tejido sano, indicando LOH. El marcador de pesos moleculares aparece en rojo junto con su tamaño en pares de bases.

Sólo en aquellos individuos heterocigotos para un determinado microsatélite podremos obtener información sobre pérdidas de material genético detectadas en forma de LOH, a estos los denominamos casos informativos. Puesto que no todos los casos analizados han sido informativos debemos realizar una corrección para calcular el porcentaje total de LOH, el cual se obtiene dividiendo los casos en los cuales detectamos LOH entre los informativos (heterocigotos). (**Tabla 3**).

**Tabla 3:** Corrección realizada para el cálculo de LOH.

$$\% \text{ CORREGIDO DE LOH} = \frac{\text{CASOS DE LOH}}{\text{CASOS INFORMATIVOS}} \times 100$$

### 3.5.1.2 Análisis del estado de metilación del promotor del gen *hMLH1*

Numerosos trabajos de investigación desarrollados durante estos últimos años están mostrando la importancia que la epigenética puede jugar en estados patológicos, entre los cuales se incluye el cáncer<sup>177,178</sup>. A nivel de ADN se ha descrito una modificación química de las bases nitrogenadas que consiste en la metilación de las citosinas en las islas CpG. Aproximadamente la mitad de los genes contienen estas islas en su región promotora y la metilación de las mismas provoca el silenciamiento del gen y por tanto la ausencia de su proteína en la célula que sufre este tipo de modificación. De los dos genes incluidos en este estudio sólo se ha descrito este fenómeno en la región promotora del gen *hMLH1*<sup>109-111</sup>. Existen diferentes técnicas para el estudio del estado de metilación. La elegida en este estudio se basa en el empleo de digestiones enzimáticas del ADN utilizando enzimas sensibles al estado de metilación. La razón de elegir esta técnica fue la sencillez y reproducibilidad, además de requerir un equipamiento accesible y económico. El protocolo experimental consta básicamente de: digestión de las muestras de ADN genómico con enzimas sensibles a metilación, amplificación mediante PCR del fragmento que contiene en su interior la diana de restricción, y análisis de los amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa.

### 3.5.1.3 Análisis de las secuencias de nucleótidos de los genes *hMLH1* y *hMSH2*

Mediante secuenciación directa del ADN genómico de los sujetos de estudio se puede conocer cual es la secuencia de bases de cualquier fragmento de ADN. El estudio de la secuencia permite detectar las diferencias que pueden existir entre individuos distintos e incluso entre distintos tejidos procedentes del mismo individuo como resultado de mutaciones somáticas. Estas variaciones en la secuencia de nucleótidos de un gen pueden ser patogénicas o no, dependiendo de cómo afecte dicho cambio a la estructura y por tanto a la función de la proteína por él codificada, o a la expresión de dicho gen. Cuando un mismo cambio aparece frecuentemente en la población es poco probable que afecte de forma importante a la viabilidad del individuo, de lo contrario habría desaparecido de la misma por selección natural. A estos cambios que aparecen en un porcentaje de individuos superior al 1% se les denomina polimorfismos. Las variaciones poco comunes en la población general tienen alta probabilidad de ser mutaciones patogénicas, generalmente afectan negativamente a la función de la proteína que codifican y suelen aparecer ligadas a algún tipo de enfermedad. Las variaciones en la secuencia de nucleótidos es una forma de alteración que puede afectar a todos los genes, a diferencia de lo que ocurre con las modificaciones del estado de metilación de las regiones promotoras.

Tras la secuenciación de cada uno de los exones de *hMLH1* y *hMSH2*, podemos obtener información en cuanto al tipo de mutación (puntual, inserción, delección), la extensión en número de bases de la misma, el codón afectado y el cambio de aminoácido si lo hubiese.

#### **3.5.1.4 Alineamiento de secuencias de aminoácidos.**

Consiste en realizar una comparación de secuencias de aminoácidos entre distintas especies con objeto de valorar cual es el grado de conservación evolutiva entre ellas. En el presente estudio se seleccionaron las regiones en las que se habían detectado mutaciones para realizar el análisis. Un grado de conservación alto indica que esa región es muy importante para la función de la proteína, son regiones que no admiten cambios y generalmente cualquier variación provocará una alteración de su función. Regiones con menor importancia funcional admiten un número mayor de variaciones sin que cambie sustancialmente la actividad de la proteína. Se suele admitir que mutaciones en zonas de alta conservación tienen una mayor probabilidad de resultar patogénicas, que aquellas que aparecen en regiones poco conservadas.

#### **3.5.1.5 Predicción de la estructura secundaria de las proteínas mutantes**

Supone otra aproximación de tipo informático que permite predecir si los cambios detectados en la secuencia de aminoácidos de las proteínas *hMLH1* y *hMSH2* provocan alteraciones en su estructura secundaria. El programa informático utilizado está disponible en la dirección: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/dompred/DomPredform.html>., donde introducimos la secuencia de aminoácidos tanto de la proteína nativa como las que portan las mutaciones detectadas mediante el estudio de secuenciación. Una vez obtenida la predicción realizamos una comparación de las secuencias mutantes con la secuencia nativa, de forma que podamos establecer el grado de variación en la estructura secundaria.

### **3.5.2 Variables independientes**

Se elaboró un protocolo de recogida de datos que incluyó los siguientes grupos de variables:

#### **3.5.2.1 Variables sociodemográficas**

- Edad en años cumplidos.
- Sexo.

#### **3.5.2.2 Variables relacionadas con el tumor actual**

- Motivo de consulta: Especificando la causa (síntomas o signos) por los que el paciente acudió a la consulta por primera vez:
  - Masa palpable.
  - Hematuria.
  - Dolor.
  - Hallazgo incidental.
  - Otros síntomas o signos.
- Lateralidad. Si el tumor aparece en riñón derecho, izquierdo o se produjo presentación bilateral.
- Localización del tumor. Según aparezca en:
  - Polo superior renal.
  - Polo inferior renal.
  - Mesorrenal.
- Tipo de cirugía realizada:
  - Nefrectomía radical abdominal.
  - Nefrectomía radical lumbar.

- Nefrectomía parcial.
  - Tumorectomía.
  - Inoperable.
- Presencia de complicaciones: Aquellas acontecidas tras la intervención quirúrgica. Se dividieron en tres grupos:
  - Intraoperatorias: las que aparecieron durante el acto quirúrgico.
  - Postoperatorias inmediatas: las que se produjeron durante la primera semana tras la realización de la cirugía.
  - Postoperatorias tardías: las desarrolladas transcurrida la primera semana desde la intervención.
- Tiempo de ingreso. Tiempo en días desde el día de la intervención quirúrgica hasta el alta hospitalaria o, en su caso, hasta el día en que se produjo el *exitus* del paciente que permaneciera ingresado.
- Tamaño tumoral. Por medición del patólogo sobre la pieza quirúrgica:
  - Menor de 4 cm.
  - Entre 4 y 7 cm.
  - Mayor de 7 cm.
- Multiplicidad. Cuando se encontró más de un tumor en la misma unidad renal. También se consideraron múltiples los casos con afectación bilateral.
- Estudio anatomopatológico del tumor.
  - Tipo histológico del tumor:
    - Carcinoma de células claras.
    - Carcinoma cromofílico o papilar.
    - Carcinoma cromóforo.
    - Oncocitoma.



- Carcinoma de los ductos de Bellini.
- Carcinoma con diferenciación sarcomatoide.
- Inclasificados, considerados como tales los subtipos con componentes mixtos y no clasificados en ninguno de los anteriores.
  - Grado nuclear según la clasificación de Fuhrman <sup>179</sup>.
  - Estadío tumoral según la clasificación TNM de la UICC <sup>144</sup>.
- Asociación sincrónica o metacrónica con tumores de otra localización.

### 3.6 METODOLOGÍA EMPLEADA

#### 3.6.1 Purificación de ADN

Las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su procesamiento. Para la obtención y purificación del ADN geonómico tumoral, se utilizó el kit comercial KIAamp DNA mini kit (Qiagen<sup>®</sup>), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 3.6.1 Análisis de secuencias microsatélites

Para realizar este estudio se utilizaron los 5 microsatélites del panel de Bethesda <sup>112</sup>, recomendados para el estudio de la inestabilidad en microsatélites en enfermos con Síndrome de Lynch: BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346, D17S250. Las secuencias de los cebadores fueron obtenidas de Umetani <sup>180</sup>.

Además, se diseñaron cebadores para los microsatélites exónicos de *TGFβII* y *BAX* (que presentan inserciones o deleciones en un alto porcentaje de tumores con MSI), y para un microsatélite del brazo corto del cromosoma 3: D3S1611. Este último se sitúa próximo al gen *hMLH1* y se eligió con objeto de poder detectar LOH en esta

región, fenómeno que según la bibliografía es el más frecuente en los tumores renales de células claras. Los cebadores se solicitaron marcados con un fluoróforo. Un fluoróforo es una molécula capaz de excitarse con luz de una determinada longitud de onda, emitiendo fotones de distinta longitud de onda cuando vuelven a su estado de reposo los cuales pueden ser detectados por un sensor. Mediante el uso de distintos fluoróforos podemos detectar distintas moléculas en un mismo ensayo, por ello se solicitaron los cebadores marcados con 3 fluoróforos: FAM, HEX y NED. Los cebadores para amplificar los microsatélites BAT-25, D2S123 y D5S346 se marcaron con FAM, los cebadores para amplificar BAT-26, D3S1611 y *TGFβII* se marcaron con HEX, y los cebadores para amplificar D17250 y *BAX* se marcaron con NED. El uso de distintos fluoróforos permitió el análisis de distintos microsatélites en un mismo ensayo (**Figura 12**). En la **Tabla 4** se muestran las secuencias de los cebadores utilizados y condiciones de amplificación.

**TABLA 4:** Secuencia de nucleótidos y temperatura(  $T^a$ ) de hibridación de los cebadores utilizados en el estudio de microsatélites

Microsatélite	Secuencia del cebador (5'→3')	$T^a$ (°C)
BAT-25	Up: FAM-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT Dw: TCTGCATTTTAACTATGGCTC	57
BAT-26	Up: HEX-TGACTACTTTTGACTTCAGCC Dw: AACCATTC AACATTTTAAACCC	57
D2S123	Up: FAM-GCCAGAGAAATTAGACACAGTG Dw: GAGCTCTTTTGAATTGGAGG	63
D5S346	Up: FAM-TACTCACTCTAGTGATAAATCGG Dw: TTCAGGGAATTGAGAGTTACAG	61
D17S250	Up: NED-AATAGACAATAAAAATATGTGTGTG Dw: TATATATTTAAACCATTTGAAAGTG	57
D3S1611	Up: HEX-CCAGCACTTCGAGAGGCCAAG Dw: TTGCCACCATGCCTGGCTAG	63
<i>TGFβRII</i>	Up: HEX-GATGCTGCTTCTCCAAAGTGC Dw: AGATCTCAGGTCCCACACCC	63
<i>BAX</i>	Up: NED-ATTTGAGAGTGACACCCCG Dw: CTCAGCTTCTTGGTGGACGC	65

Las reacciones de amplificación de los distintos fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en un volumen final de

20 µl, conteniendo 200 µM de cada dNTP, 400nM de cada cebador, 0,4 U de *Taq* polimerasa (Biotools®) y 100 ng de ADN. El estudio se realizó con ADN tumoral y ADN de riñón sano para poder hacer una comparación y ver las posibles diferencias. El número de ciclos de amplificación para cada microsatélite osciló entre 30 y 35.

Las PCR realizadas con cebadores fluorescentes se diluyeron para que la intensidad de fluorescencia emitida por el fluoróforo quedase dentro del rango óptimo de detección del secuenciador utilizado. Posteriormente se tomó un microlitro de esta dilución y se mezcló con 20 µl de formamida y 0,4 µl del marcador de pesos moleculares DG400HD (Applied biosystems®). Se agitó la mezcla y se desnaturalizó a 95° C durante 3 minutos. Posteriormente las muestras se introdujeron en un secuenciador automático ABI PRISM 310, y se sometieron a electroforesis capilar. La temperatura de electroforesis fue de 60° C y las muestras migraron durante 20 minutos. El posterior análisis de los datos se realizó con el programa informático Genescan de Applied Biosystems®.

### **3.6.2 Análisis del estado de hipermetilación del gen *hMLH1***

#### **3.6.2.1 Digestión de las muestras con enzimas de restricción**

Disponemos de dos enzimas que reconocen la secuencia CCGG, pero difieren en su capacidad de corte dependiendo del estado de metilación de su diana. La enzima *HpaII* es sensible a metilación, y es incapaz de cortar cuando su diana esta metilada. La enzima *MspI* en cambio no es sensible a metilación y corta siempre su diana, esté o no metilada. Ambas enzimas fueron suministradas por la casa comercial Fermentas®.

Las reacciones enzimáticas de digestión se realizaron por separado durante 16 horas a 37° C en un volumen de 20 µl y se emplearon en cada una de ellas 400ng de ADN genómico y 20 U de enzima. Tras inactivar las enzimas de restricción mediante desnaturalización térmica a 65 °C durante 15 minutos el producto de digestión se empleó como molde para llevar a cabo diferentes reacciones de amplificación (PCR). Sólo si la diana de restricción no ha sido cortada se obtendrá producto de amplificación. Como control negativo del estado de metilación del promotor del gen *hMLH1* se utilizó ADN procedente de sangre venosa periférica de dos individuos sanos. Como controles positivos se usaron:

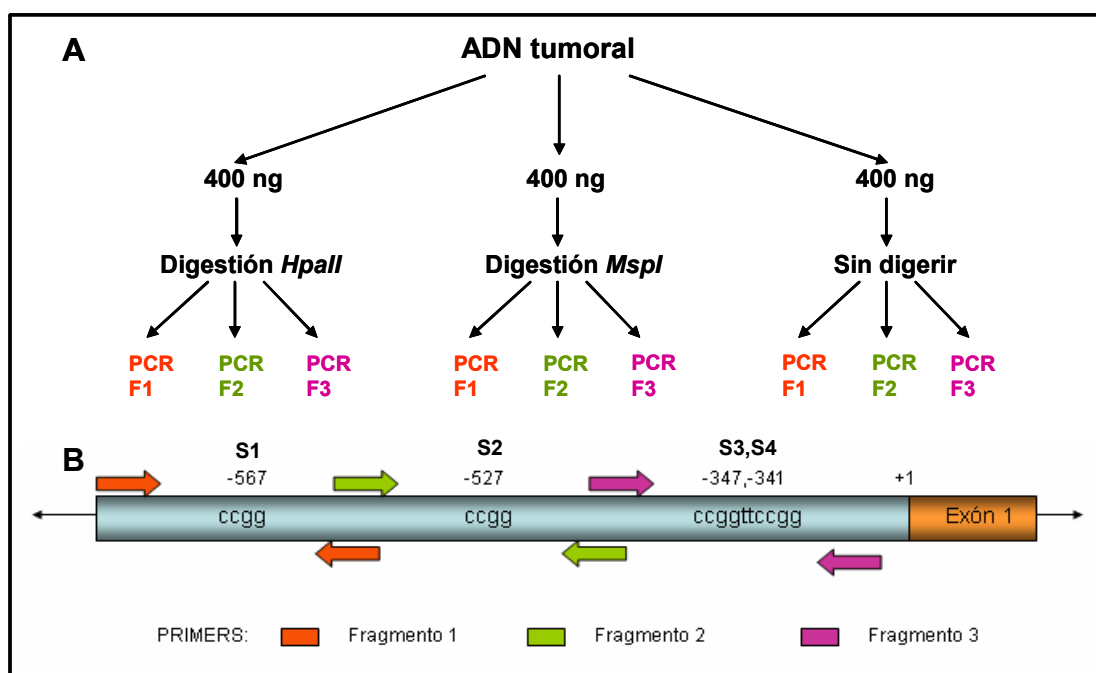
- 1) ADN tratado con la enzima metilasa *SssI*, la cual metila el ADN.
- 2) ADN extraído de la línea celular 293T procedente de tejido renal humano, caracterizada por tener inactivado por metilación el promotor del gen *hMLH1*<sup>181</sup>.

Estos ADN control fueron sometidos al mismo proceso que los procedentes de muestras tumorales, permitiendo validar la técnica en cuanto a su fiabilidad a la hora de distinguir un ADN metilado de otro que no lo está.

### **3.6.2.2 Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

En la región promotora del gen *hMLH1* existen cuatro sitios CCGG metilables, (**Figura 14**) en las posiciones S1 (-567), S2 (-527), S3 (-347) y S4 (-341). Los sitios S1 y S2 se amplificaron en reacciones independientes, mientras que los sitios S3 y S4 se amplificaron conjuntamente. Se realizaron tres reacciones de amplificación por muestra, una para cada uno de estos sitios, empleando ADN molde digerido

independientemente con las enzimas de restricción *HpaII* y *MspI*, y el mismo ADN molde sin digerir.



**Figura 14: Esquema de la metodología utilizada en el estudio de hipermetilación.** A) Digestión y PCR. A partir de cada muestra tumoral se prepararon 3 alícuotas de 400 ng cada una. De éstas una fue digerida con la enzima *HpaII*, otra con la enzima *MspI* y la última que permaneció sin digerir fue utilizada como control positivo de la PCR. B) Localización de los 4 sitios de metilación estudiados en el promotor del gen *hMLH1*. Las flechas del mismo color indican la localización de las parejas de cebadores empleados para amplificar cada una de las regiones.

El volumen total de cada reacción fue de 25  $\mu$ l, y contenía 100 ng de ADN, dNTPs (200  $\mu$ M), ADN *Taq* polimerasa (0,5 U) (Biotools®) y cebadores (400 nM). La temperatura de hibridación fue de 58°C en todos los casos y se emplearon 25 ciclos de amplificación<sup>182</sup>. En la **Tabla 5** se muestran las secuencias y condiciones de aplicación de los distintos cebadores usados en el estudio de hipermetilación.

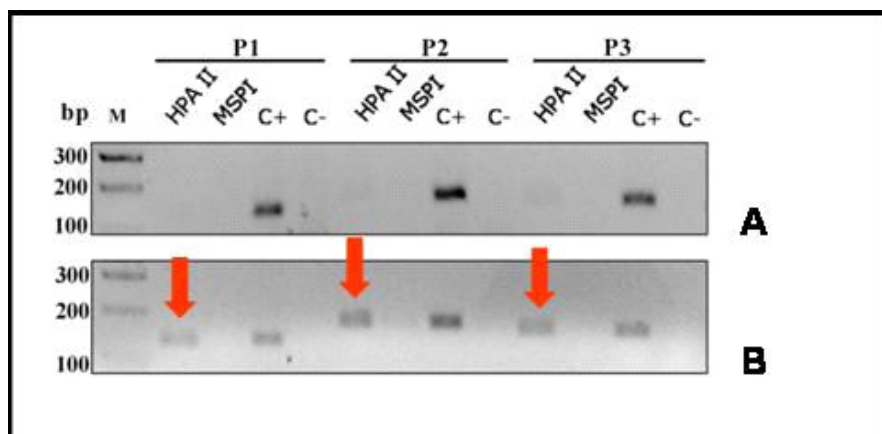
**Tabla 5: Secuencia de nucleótidos y temperatura ( $T^a$ ) de hibridación de los cebadores utilizados en el estudio de hipermetilación.**

Producto	Secuencias de cebadores (5'→3')	$T^a$ (°C)
P1	Up: AGTATTCGTGCTCAGCCTC Dw: CCAGCGTTATTTGGTGGTG	58
P2	Up: CACCACCAAATAACGCTGG Dw: TTGGCGCTTCTCAGGCTC	58
P3	Up: AGCCTGAGAAGCGCCAAG Dw: TCCGCTCTTCCTATTGGTTC	58

### 3.6.2.3 Electroforesis en gel de agarosa

De cada reacción de amplificación se analizaron 5µl en gel de agarosa al 2%, conteniendo bromuro de etidio. El tamaño del fragmento puede ser calculado en función de su movilidad electroforética en relación a un patrón de pesos moleculares. El tampón de electroforesis utilizado fue TAE al 0,5%. Una vez acabada la electroforesis se fotografió el gel con un sistema de captura de imágenes (GelDoc-it Imaging System de UVP®).

Las muestras de ADN fueron sometidas a las digestiones enzimáticas y posterior amplificación de las tres regiones del promotor que contienen las dianas de metilación. La muestra informativa para el estado de metilación es la del ADN digerido con la enzima *HpaII*. La digestión con *MspI* es un control de la técnica y sirve para mostrar que el ADN es susceptible de ser digerido, es decir, que no contiene ninguna molécula inhibidora de la reacción de digestión. La muestra **C+** contiene el producto de amplificación obtenido a partir de un ADN sin digerir, es el control positivo de la PCR y sirve para asegurar que hemos realizado correctamente la amplificación; además permite cuantificar el porcentaje de metilación del ADN estudiado al comparar esta banda con el ADN digerido con la enzima *HpaII*. La muestra **C-** constituye el control negativo de la PCR, carente de ADN, y sirve para descartar cualquier posible contaminación de los reactivos con ADN diferente al que pretendemos estudiar (**Figura 15**).



**Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa de los controles de metilación.** En el gel A observamos los productos de amplificación obtenidos tras digerir con ambas enzimas un ADN no metilado procedente de sangre de un individuo sano. En el gel B aparecen los productos obtenidos al usar un ADN metilado enzimáticamente con la enzima metilasa *SssI*.

#### 3.6.2.4 Análisis densitométrico

Puesto que en algunas de las muestras tumorales obtuvimos una mínima banda de amplificación al usar como molde ADN digerido previamente con la enzima *HpaII*, cabía la posibilidad de que en estas muestras hubiese una metilación monoalélica. Si este fuese el caso, la intensidad de la banda de amplificación obtenida a partir de ADN digerido con la enzima *HpaII* debería de ser del 50% respecto a la banda procedente del ADN sin digerir (control positivo de la PCR).

Para realizar este cálculo se utilizó el programa informático Quantity One 4.1 de Bio-rad®. Se cuantificó la intensidad de las bandas obtenidas como producto de la PCR, tanto a la banda de digestión con *HpaII* como la del control positivo y se les restó a ambas el ruido de fondo. Luego se dividió la intensidad de la banda *HpaII* entre la del control positivo C+ y se multiplicó por cien. (**Tabla 6**)

**Tabla 6:** Cálculo de la intensidad de las bandas obtenidas como producto de amplificación utilizando como molde ADN digerido con la enzima *HpaII* respecto del control positivo de metilación.

$$\frac{\text{HpaII - ruido de fondo}}{\text{C+ - ruido de fondo}} \times 100$$

Esto nos da el porcentaje de intensidad de la banda de *HpaII* respecto a la del control positivo, y permitió saber si en estas muestras había una metilación monoalélica o se trataba simplemente de una digestión incompleta del ADN

### 3.6.3 Análisis de la secuencia de nucleótidos de los genes *hMSH1* y

#### *hMSH2*

Para realizar este análisis fue necesario diseñar cebadores para cada uno de los exones, amplificar los exones por PCR, purificar los amplificados y realizar con ellos la reacción de secuenciación. Posteriormente estas reacciones se sometieron a electroforesis capilar en un secuenciador modelo ABI PRISM 3100 y se analizaron mediante el programa informático Chromas Pro®.

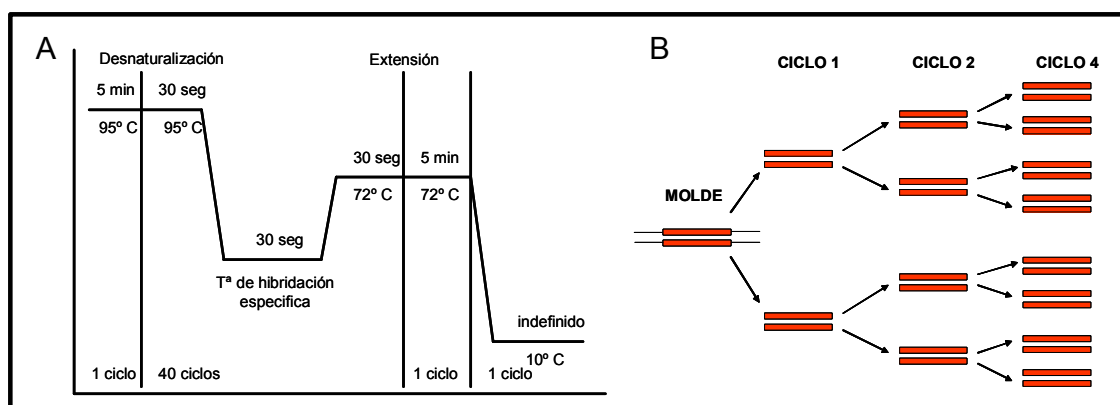
#### 3.6.3.1 Diseño de cebadores

Utilizando el programa informático PrimerExpress de Applied biosystems® se diseñaron cebadores para amplificar los 19 exones del gen *hMLH1* y los 16 del *hMSH2*. En las **tablas 6 y 7** se exponen los cebadores y condiciones de amplificación para cada exón de los genes MMR estudiados.



### 3.6.3.2 Reacciones de PCR

La técnica de la PCR es crucial en biología molecular actual. La mayoría de estudios genéticos se basan en su utilización, y proporcionó a su inventor Kary Mullis<sup>183</sup> el Premio Nobel de Química en 1993. Esta técnica permite realizar una gran cantidad de copias de cualquier fragmento genético que pretendamos estudiar. Para ello sólo necesitamos un ADN molde, cebadores, *Taq* polimerasa, desoxinucleótidos, un tampón de reacción (Buffer) adecuado, y un termociclador que realizará los sucesivos ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión. **(Figura 16A)**. En el termociclador el tubo se calienta a 95°C para provocar la desnaturalización de las hebras de ADN, luego la temperatura baja para permitir la hibridación de los cebadores, y posteriormente vuelve a subir hasta los 72°C, que es la temperatura óptima de polimerización de la *Taq* polimerasa. Con este proceso conseguimos copiar el fragmento de ADN situado entre las zonas de hibridación de los cebadores. El proceso se repite entre 35 y 40 veces, duplicándose en cada ciclo el número de copias. **(Figura 16B)**. Gracias a esto obtenemos una gran cantidad de ADN con el que poder trabajar.



**Figura 16:** Esquema de un proceso de PCR A) se distintos pasos con sus tiempos y temperaturas. B) Representación del proceso de amplificación exponencial.

El proceso se inició con la puesta a punto de las condiciones óptimas de amplificación de cada pareja de cebadores, mediante la realización de gradientes de temperatura se eligió la temperatura de hibridación más adecuada para cada pareja de cebadores. Las reacciones de PCR se realizaron en 50  $\mu$ l conteniendo 200 mM de cada desoxirribonucleótido (dNTP), 400nM de cada cebador y 0,4 U de *Taq* polimerasa (Biotools®). Para la amplificación del exón 2 del gen *hMLH1* y del exón 1 del gen *hMSH2* fue necesaria a adición de dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% a la mezcla de reactivos citada anteriormente (indicado en la tabla con un asterisco \*). El DMSO es un compuesto desnaturizante que rebaja las temperaturas de desnaturización y la de hibridación de los cebadores utilizados. Es útil cuando la zona a amplificar es rica en guanina y citosina, y presenta por tanto una alta temperatura de desnaturización, y también para eliminar productos de amplificación inespecíficos que pueden aparecer al realizar la PCR. En nuestro caso fue la eliminación de bandas de amplificación inespecíficas que podrían dificultar el estudio el motivo de utilización del DMSO. Los productos de la reacción fueron purificados con objeto de eliminar los cebadores no consumidos en la reacción de amplificación y que podrían interferir en la reacción de secuenciación. Para ello se utilizaron las placas PCR Cleanup Kit (Millipore®), siguiendo las instrucciones del fabricante. En las **tablas 6 y 7** se detallan las secuencias y temperaturas de hibridación de los cebadores utilizados.

**Tabla 7:** Secuencia de nucleótidos y temperatura ( $T^a$ ) de hibridación de los cebadores utilizados en el estudio de secuenciación del gen *hMLH1*

Exón	Secuencias del cebador (5'→3')	$T^a$ (°C)
1	Up: CTGGATGGCGTAAGCTACAGC Dw: TCGTAGCCCTTAAGTGAGCCC	65
2*	Up: ACATTAGAGTAGTTGCAGACTG Dw: AAACATCCTGCTACTTTGAG	54
3	Up: TTTGGAAAAATGAGTAACATG Dw: TCACAGGAGGATATTTTACAC	55
4	Up: GCAGTGAGTTTTTCTTTTCAGTC Dw: GGATTACTCTGAGACCTAGGC	55
5	Up: CCCTTGGGATTAGTATCTATC Dw: AACAATTTACTCTCCCATGTAC	55
6	Up: CTTGGGTTTTATTTCAGGTAC Dw: AAATCTCAGAGACCCACTCC	55
7	Up: AGTGTGTGTTTTTGGCAACTC Dw: AAAACCATCCCCCATAAACC	53
8	Up: CTTGTGTCTTCTGCTGTTTG Dw: TAATGTGATGGAATGATAAACC	55
9	Up: GGAACCTTGTGTTTTAAATTC Dw: GTGAGTGGATTTCCTCATGTG	47
10	Up: AGGACAGTTTTGAAGTGGTTGC Dw: TTGGTTGAGGAGTTTGGTGC	63
11	Up: TATGTGGGCTTTTTCTCCCC Dw: AGGCCCCAGAGAAGTAGCTG	64
12	Up: GCTTCTTTCTTAGTACTGCTCC Dw: AAAAGCCAAAGTTAGAAGGC	61
13	Up: TGATCTGCACTTCCTTTTCTTC Dw: CAGTTGAGGCCCTATGCATC	62
14	Up: GGGTTGGTAGGATTCTATTAC Dw: CTGCTTGTTTCACACACTCAG	59
15	Up: TGAATTCAGCTTTTCCTTAAAG Dw: GAAACGATCAGTTGAAATTC	57
16	Up: AGCTTGCTCCTTCATGTTCTTG Dw: CCGGCTGGAAATTTTATTTG	62
17	Up: TATTTCTTGTTCCCTTGTC Dw: CCGAAATGCTTAGTATCCTGC	56
18	Up: TGATCTCCGTTTAGAATGAGAATG Dw: TTGTATGAGGTCCTGTCCTAGTCC	59
19	Up: AAACAGGGAGGCTTATGACATC Dw: AGAACACATCCCACAGTGC	57

\* CON 5% DMSO

**Tabla 8:** Secuencia de nucleótidos y temperatura ( $T^{\circ}$ ) de hibridación de los cebadores utilizados en el estudio de secuenciación del gen *hMSH2*

Exón	Secuencias del cebador (5'→3')	T <sup>a</sup> (°C)
1*	Up: TGGTCGCCGTGGCCGGACGC Dw: TCCCCAGCACGCGCCGTCCC	65
2	Up: CATGTAATATCTCAAATCTGTAATG Dw: TTCACATTTTTATTTTCTACTC	56
3	Up: GAGTTTGGATTTTTCTTTTGC Dw: TTCCTAGGCCTGGAATCTCC	58
4	Up: CTTTTCTTATTCCTTTTCTCATAG Dw: TAATTCACATTTATAATCCATG	54
5	Up: TGGATCCAGTGGTATAGAAATC Dw: CCTTTATAAGCTTCTTCAGTATATG	56
6	Up: AGGTTTTCACATAATGAGCTTGCC Dw: AATCATGTGGGTAAGTGCAGG	59
7	Up: GATTTAGTTGAGACTTACGTGC Dw: GCACATTGCCAAGTATATATTG	60
8	Up: AATGATGCTTGTTTATCTCAGTC Dw: TACAACTTTCTTAAAGTGGCC	60
9	Up: TTACCCATTATTTATAGGATTTTG Dw: AATTATTCCAACCTCCAATGAC	60
10	Up: GGAATACTTTTTCTTTTCTTCTTG Dw: AAGGGTTAAAAATATAATAACGAC	56
11	Up: CTTTGGATATGTTTCACGTAGTAC Dw: AGGTGACATTCAGAACATTATTAG	60
12	Up: TTCAGTATTCCTGTGTACATTTTC Dw: ACAAACGTTACCCCCACAAAG	60
13	Up: GCAGAAAGAAGTTTAAATCTTGC Dw: CATTCTATCTTCAAGGGACTAGG	60
14	Up: TGTTACCACATTTTATGTGATGGG Dw: CCCATTACCAAGTTCTGAATTTAG	60
15	Up: TTCTCATGCTGTCCCCTCAC Dw: AAAAACCTTCATCTTAGTGTCTG	60
16	Up: TTTAATTACTAATGGGACATTAC Dw: CAGTTAACTATGGAAAAAGG	60

\* CON 5% DMSO

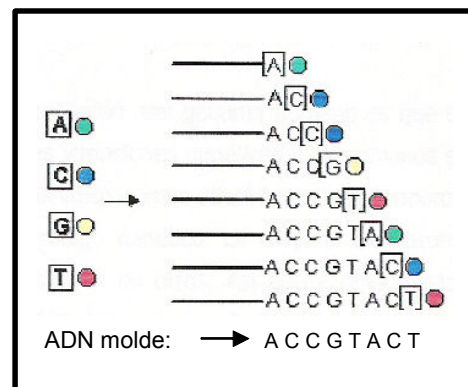
### 3.6.3.3 Reacción de secuenciación

Esta técnica permite conocer la secuencia de las bases de un fragmento de ADN. En nuestro caso el ADN que se utilizó fueron productos de PCR purificados de los exones de los genes *hMLH1* y *hMSH2*. La reacción de secuenciación está basada en la PCR y comparte muchas similitudes con ella. Necesita polimerasa que sintetice una hebra a partir de otra usada como molde, un buffer de reacción adecuado, cebadores y un termociclador que realice la alternancia de ciclos de temperatura necesarios para la copia del ADN molde.

En cuanto a las diferencias podemos decir que son dos: la presencia de nucleótidos terminadores marcados con un fluoróforo y la utilización de un sólo cebador para la síntesis. Los nucleótidos marcados son minoritarios respecto a los normales y cada base se marca con un color. Los nucleótidos marcados no tienen el grupo OH del extremo 3', con lo cual cuando se incorpora uno a la hebra en extensión la reacción de síntesis se detiene. Esta reacción de copia nos rinde una gran cantidad de fragmentos de distintos tamaños que varían de tamaño en una sola base, y dependiendo de la última base incorporada emitirán una u otra fluorescencia. Al separarlos mediante electroforesis capilar todos los fragmentos de un mismo tamaño (que tendrán en última posición la misma base marcada con el mismo color) migrarán a la misma velocidad. Al final del capilar se encuentra un láser y un detector, cuando los fragmentos marcados llegan a este punto son excitados por el láser y emiten una fluorescencia que es recogida por el detector. La fluorescencia emitida depende del fluoróforo, y al estar cada base marcada con uno de ellos, podemos saber qué base posee ese fragmento en su extremo 3'. La fluorescencia es analizada por un sistema informático de análisis que nos dará un patrón de picos de color correspondiente cada pico a una base.

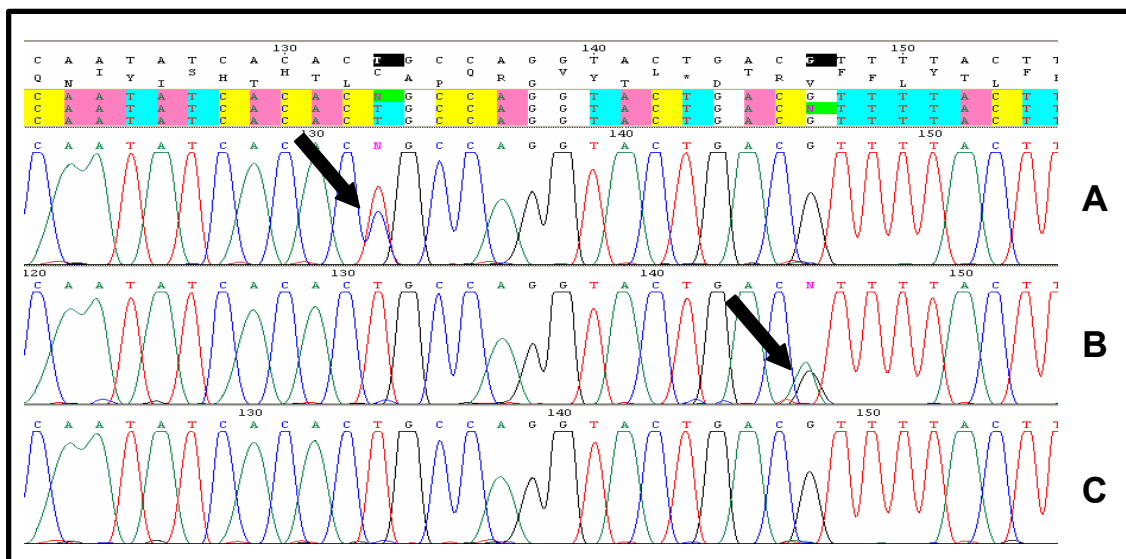
La otra diferencia es la utilización de un solo cebador; la razón es que dependiendo de qué cebador de la pareja utilizemos secuenciaremos una hebra o su complementaria. Si se añadieran los dos cebadores obtendríamos dos secuencias solapadas que serían ilegibles. En la **figura 17** se detalla el proceso.

**Figura 17: Esquema de la reacción de secuenciación:** en el método de secuenciación cada base se marca con un color. Al realizar la electroforesis los fragmentos pequeños migran más rápidamente que los de mayor tamaño. La velocidad de migración depende de la longitud de los fragmentos de ADN. El detector registrará una sucesión de colores que será: Verde, azul, azul, amarillo, rojo, verde, azul, rojo y que se corresponde a la secuencia:



La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un volumen total de 7  $\mu$ l, conteniendo 4  $\mu$ l de PCR purificada, 2  $\mu$ l de Kit de secuenciación Seq BigDye V3.1 (Applied Biosystems®) y 1  $\mu$ l de cebador 10  $\mu$ M. Tras ser purificada con placas Sequencing Reaction Cleanup Kit (Millipore®) se analizaron en un secuenciador automatico ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®).

El análisis de secuencias se realizó con el programa informático Chromas Pro 1.41, que permite la alineación de varias secuencias de forma que podemos detectar las variaciones de forma visual (**Figura 18**).



**Figura 18:** Alineación de secuencias utilizando el programa Chromas Pro 1.41. Podemos apreciar como en las secuencias superiores A y B aparece una mutación en heterocigosis en cada una (señalada por la flecha), abajo en la secuencia C aparece la secuencia normal usada como control.

En los casos donde se encontraron mutaciones se realizó una confirmación secuenciando el mismo fragmento en dirección contraria. Además se analizó también ADN del tejido renal sano, para determinar si se trataba de una mutación somática propia del tumor o bien constitutiva afectando a todas las células del individuo.

### **3.6.4 Alineamiento de secuencias de aminoácidos**

Para realizar este estudio se utilizó el programa informático clustal W, descrito por primera vez en 1994 <sup>184</sup>, y actualizado recientemente <sup>185</sup>. Este programa puede descargarse de la página [www.clustal.org](http://www.clustal.org), o bien usarse online en la dirección: <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/clustalw2/>. Las secuencias proteicas fueron obtenidas de la página del NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

## **3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **3.7.1 Análisis descriptivo**

Para describir la distribución de cada variable como índices estadísticos, se calcularon porcentajes en el caso de variables cualitativas y medidas de tendencia central y dispersión para sintetizar la distribución de las variables cuantitativas, así como sus intervalos de confianza. Como índices complementarios, se consideró en estas últimas la asimetría de la distribución y el grado de apuntamiento respecto de la ley normal, con objeto de comprobar la idoneidad en la aplicación de posteriores tests estadísticos que exigen la normalidad de la distribución de las variables.

Los datos fueron sintetizados mediante la oportuna tabulación y representados gráficamente mediante diagramas de barras o polígonos de frecuencias en el caso de variables cuantitativas discretas.

### **3.7.2 Análisis bivalente**

Para estudiar la asociación o relación entre dos variables cualitativas se utilizó una prueba de independencia para comparar proporciones observadas en grupos independientes ( $\chi^2$ -cuadrado), verificándose las condiciones de aplicación (efectivos esperados no inferiores a 5, o no inferiores a 3 empleando corrección de Yates). Cuando no se cumplieron las condiciones de aplicación se empleó la prueba exacta de Fisher.

En el caso de una variable cualitativa binaria y otra con más de dos categorías ordenadas, se aplicó la prueba de tendencia lineal de Mantel-Haenscel, con objeto de establecer una asociación lineal significativa.

Para estudiar la relación entre una variable cualitativa binaria y una cuantitativa, se utilizó la prueba “*t*” de comparación de medias en grupos independientes basada en la ley de Student-Fisher. La hipótesis de igualdad de varianzas se verificó con la prueba F basada en la ley de Snedecor, suponiendo en ambas pruebas que la variable cuantitativa seguía en la población una ley normal por tratarse de muestras consideradas grandes desde el punto de vista estadístico. Por último, se utilizaron pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney en grupos independientes) cuando la distribución de alguna de las variables presentaba marcadas anomalías (asimetría, etc.) o al comparar grupos pequeños, cuando se vulneraban los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas.

En la comparación de medias en más de dos grupos independientes se utilizó el Análisis de Varianza y la prueba “H” de Kruskal-Wallis, empleando esta última cuando



no se verificaban las condiciones de aplicación de la primera (homogeneidad de varianzas) o en el caso de variables con categorías ordenadas.

## **IV. RESULTADOS**

## **4.1 RECOGIDA DE LAS MUESTRAS**

En el presente estudio se recogieron muestras de tejido tumoral y tejido renal sano procedentes de 89 pacientes que fueron intervenidos por carcinoma de células renales. La cirugía realizada de forma mayoritaria consistió en nefrectomía radical: 65 casos (73,0%), bien fuera por vía lumbar (42 enfermos, 47,2%) o vía abdominal (23 pacientes, 25,8%). En 22 casos (24,7%) se realizaron nefrectomías parciales electivas, con un margen de parénquima renal sano que permitió extraer tejido para su estudio. En 2 pacientes (2,2%) se realizó una laparotomía exploradora considerándose el tumor irreseccable, por lo que únicamente se tomó biopsia tumoral de estas muestras para el análisis. En estos dos casos la muestra control utilizada consistió ADN extraído de muestras sanguíneas. Un paciente con tumor bilateral fue sometido a nefrectomía radical de un lado y parcial del otro, ambas por vía lumbar.

Como grupo control se incluyeron muestras de sangre de 95 sujetos diagnosticados de patologías urológicas benignas, a partir de las cuales se extrajo ADN.

## **4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES**

La edad media de los pacientes con carcinoma de células renales en el momento de realización de la cirugía fue de 63,8 años (Desviación Estándar: 11,5; Intervalo de Confianza al 95%: 61,4 – 66,2). La mediana fue de 65,6 años y aunque la muestra presentó una morfología asimétrica, no difirió significativamente de la distribución normal según la prueba de Kolmogorov-Smirnov ( $Z=0,818$ ;  $p=n.s.$ ). La muestra estaba formada por 59 hombres (66,3%) y 30 mujeres (33,7%), lo cual supone una relación

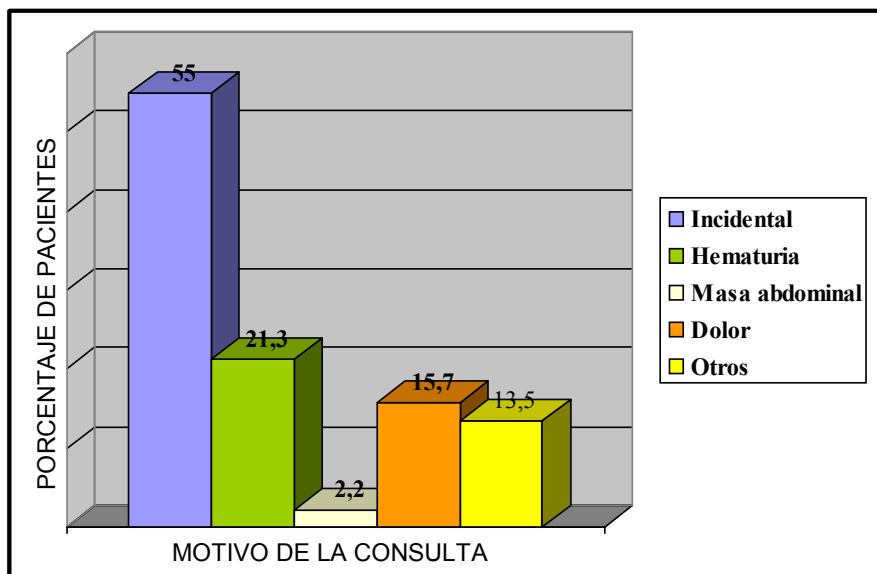
hombre/mujer de 1,96:1. No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad y sexo.

La edad media del grupo control fue de 65,0 años (DE: 10,9; IC 95%: 62,1 – 66,9), siendo un 78,6% hombres. No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad y sexo en los sujetos del grupo control. Tampoco hubo diferencias significativas en cuanto a la edad media y porcentajes de hombres y mujeres entre el grupo de enfermos con carcinomas de células renales y el grupo control.

#### **4.2.1 Motivo de consulta**

El motivo más frecuente por el que acudieron a la consulta los pacientes con carcinoma de células renales fue su hallazgo incidental al realizar una prueba de imagen por otro motivo, lo que ocurrió en 49 ocasiones (55,0%). En el resto de casos los pacientes consultaron por diversas causas como hematuria, dolor, masa abdominal, etc..., como se muestra en la **Figura 19**. Seis pacientes presentaban, en el momento de la consulta, clínica acompañante al síntoma principal (dolor en 3 casos y en uno respectivamente hematuria, masa abdominal y otro tipo de clínica). Un único paciente presentó la triada clásica de Guyon: hematuria, dolor y masa abdominal.

De los motivos clasificados como “otros”, encontramos síntomas como síndrome constitucional en 4 pacientes, fiebre de origen desconocido en 1 y en el resto distintas manifestaciones producidas por la existencia de metástasis a distancia.



*Figura 19: Porcentajes de cada uno de los motivos de consulta.*

#### 4.2.2 Lateralidad y localización tumoral

Los tumores presentaron una ligera preferencia por el riñón derecho que fue el afectado en 51 pacientes (57,3%). Hubo un solo caso de tumores bilaterales y únicamente dos casos (2,2%) de tumores múltiples.

En lo que se refiere a la localización topográfica dentro del riñón, la más frecuente fue la mesorrenal que aconteció en 42 casos (47,2%) y el resto se localizó prácticamente por igual tanto a nivel de polo inferior o superior.

#### 4.2.3 Tratamiento de los pacientes

Las técnicas de cirugía empleadas ya han sido descritas en el apartado 4.1. El tiempo medio de estancia de los pacientes desde que ingresaron hasta que fueron dados de alta fue de 8,9 días (DE: 6,2, IC 95%: 7,6–10,2) con una mediana de 7 días. Los días

de estancia hospitalaria no siguieron un patrón de distribución normal ( $Z = 2,574$ ;  $P < 0,0001$ ).

No se encontraron diferencias en cuanto al tipo de cirugía practicada (radical o conservadora) y los días de estancia hospitalaria.

#### 4.2.4 Complicaciones

En general, se produjo algún tipo de complicación en 24 pacientes (27,0%). Dichas complicaciones las dividimos en intraoperatorias y postoperatorias bien sean inmediatas o tardías (**Tabla 9**). Cinco pacientes presentaron dos complicaciones distintas, por lo que en total aparecieron 29 eventos de complicación.

**Tabla 9:** *Complicaciones derivadas de la cirugía*

<b>Complicaciones intra-operatorias (12,4%)</b>		<b>Complicaciones post-operatorias inmediatas (13,5%)</b>		<b>Complicaciones post-operatorias tardías (6,7%)</b>	
Apertura pleural	8	Sangrado	4	Absceso	2
Lesión esplénica	2	HDA	3	Urinoma	1
Lesión enteral	1	Íleo	2	Hernia lumbotomía	1
		RAO	1	Dolor crónico	1
		Ascitis	1	Derrame pleural	1
		TEP	1		
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>Total</b>	<b>6</b>
HDA: hemorragia digestiva; RAO: retención aguda de orina; TEP: tromboembolismo pulmonar					

Dentro de las complicaciones intra-operatorias, que ocurrieron en 11 casos (12,4%), la más frecuente fue la apertura accidental de la pleura que se produjo en 8 ocasiones y que se repararon inmediatamente, siendo necesario únicamente en un caso

la colocación de un dren de neumotórax. En un caso se produjo lesión ureteral que se suturó en el mismo acto quirúrgico previa colocación de catéter de doble J.

En 12 pacientes (13,5%) se produjeron complicaciones durante el postoperatorio inmediato. La complicación más frecuente fue el sangrado apareciendo en 4 pacientes (4,5%), que fue tratado de manera conservadora excepto en un caso que requirió revisión quirúrgica y esplenectomía tras comprobar la presencia de una fisura esplénica.

Las complicaciones post-operatorias tardías sucedieron en 6 pacientes (6,7%) siendo la más frecuente la existencia de absceso a nivel del lecho quirúrgico, que se trataron mediante antibioterapia y drenaje percutáneo bajo TAC.

No se constató relación entre la existencia de complicaciones con la edad, sexo o tipo de cirugía realizada.

Los pacientes con complicaciones post-operatorias inmediatas presentaron una media de días de ingreso superior a los que no tuvieron estas complicaciones: 14, 2 (DE: 9,2) días frente a 8,1 (DE: 5,3) ( $p<0,0001$ ).

#### **4.2.5 Características macroscópicas del tumor.**

##### **4.2.5.1 Tamaño del tumor.**

El tamaño tumoral más comunmente hallado fue el comprendido entre 4 y 7 cm, que se encontró en 41 casos (46,1%). En la **Tabla 10** se exponen los porcentajes de los distintos tamaños de todos los tumores según las mediciones del patólogo sobre la pieza quirúrgica.

**Tabla 10:** Características anatomopatológicas de los tumores analizados

		n	%
<b>Multiplicidad</b>	No	87	97,8
	Si	2	2,2
<b>Tamaño tumoral</b>	< 4 cm	22	24,7
	4-7 cm	41	46,1
	> 7 cm	26	29,2
<b>Lateralidad</b>	derecho	51	57,3
	izquierdo	37	41,6
	bilateral	1	1,1
<b>Localización</b>	Mesorrenal	42	47,2
	Polo superior	24	27,0
	Polo inferior	23	25,8
<b>Grado celular de Fuhrman</b>	1	8	9,0
	2	50	56,2
	3	18	20,2
	4	10	11,2
	No catalogado	3	3,4
<b>Tipo histológico</b>	Células claras	59	66,3
	Papilar	11	12,4
	Cromóforo	8	9,0
	Oncocitoma	2	2,2
	Sarcomatoide	5	5,6
	Otros	4	4,5
<b>Estadio pT</b>	pT1a	20	22,5
	pT1b	31	34,8
	pT2	16	18,0
	pT3a	12	13,5
	pT3b	6	6,7
	pT4	4	4,5
<b>Estadio pN</b>	pNx	65	73,0
	pN0	18	20,2
	pN1	4	4,5
	pN2	2	2,2
<b>Estadio pM</b>	pMx	1	1,1
	pM0	73	82,0
	pM1	15	16,9
<b>Estadio TNM</b>	I	47	52,8
	II	15	16,9
	III	12	13,5
	IV	15	16,9

El tamaño tumoral presentó una relación significativa con el motivo de consulta ( $p<0,001$ ), de manera que el hallazgo incidental se produjo en mayor proporción en



aquellos tumores de menor tamaño (<4 cm), aunque fue el motivo de consulta más frecuente en todos los tamaños. Estos datos se muestran en la **Tabla 11**.

**Tabla 11:** Relación entre el tamaño tumoral con el motivo de consulta de los pacientes y localización del tumor.

	Tamaño tumoral		
	< 4 cm n (%)	4-7 cm n (%)	> 4 cm n (%)
<b>Motivo de consulta</b>			
Masa abdominal	-	-	2 (7,7)
Hematuria	1 (4,5)	11 (26,8)	6 (23,1)
Dolor	-	5 (12,2)	5 (19,2)
Incidental	19 (86,4)	20 (48,8)	9 (34,6)
Otros	2 (9,1)	5 (12,2)	4 (15,4)
<b>Localización del tumor</b>			
Mesorrenal	7 (31,8)	17 (41,5)	18 (69,2)
Polo superior	5 (22,7)	14 (34,1)	5 (19,2)
Polo inferior	10 (45,5)	10 (24,4)	3 (11,5)

Los tumores de localización mesorrenal tuvieron un tamaño superior a 7 cm en el 69,2% de los casos, mientras que los que se localizaron en el polo inferior tuvieron un tamaño inferior a 4 cm ( $p=0,05$ ) en un 45,5% de los casos. La **Tabla 11** muestra la localización de los tumores según el tamaño tumoral.

También presentó significación estadística la relación entre el tamaño del tumor y el tipo de cirugía practicada ( $p<0,0001$ ), ya que se realizó nefrectomía radical en el 85,4% de los tumores de 4-7 cm y en el 84,6% de los mayores de 7 cm. Por el contrario, el 54,4% de los tumores menores de 4 cm fueron sometidos a cirugía conservadora.

#### **4.2.5.2 Tipo histológico.**

La variante histológica más frecuentemente hallada fue el carcinoma renal de células claras (CRCC), representando un 66,3% (59 casos) de los casos, seguido de CCR papilar en un 12,4% (11 casos). En la **Tabla 10** se muestran las frecuencias de los distintos subtipos anatomopatológicos. Los casos dentro de la variante inclasificada incluyen subtipos celulares difíciles de identificar o patrones arquitectónicos mixtos.

Atendiendo a los tres subtipos histológicos más frecuentes, se encontró relación estadística con la edad ( $p>0,0001$ ), de modo que los pacientes con CRCC tenían una media de edad de 65,3 años (DE: 11,1; IC 95%: 62,4-68,2), sensiblemente superior que la de los pacientes afectados con tumores cromóforos, los cuales presentaron una edad media de 58,1 años (DE: 8,7; IC 95%: 50,8–65,4). Los enfermos con tumores papilares presentaron una edad media de 64,2 años (DE: 14,4; IC 95%: 54,6–74,0).

#### **4.2.5.2 Grado nuclear.**

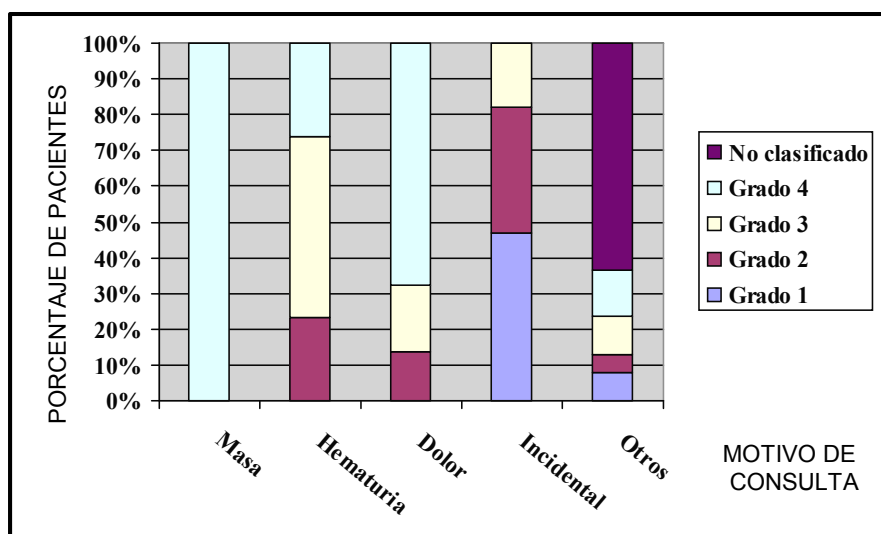
Respecto al grado nuclear de Fuhrman, un 65,2% (58 casos) fueron de grado 1-2. En un caso no pudo ser catalogado el grado nuclear. Los porcentajes de cada grado nuclear se muestran en la **Tabla 10**.

El grado nuclear se relacionó con la localización tumoral ( $p<0,0001$ ), de forma que el 100% de los tumores de grado 4 de Fuhrman y el 61,1% con grado 3 presentaron una localización mesorrenal así como el 50% los de grado 1 en el polo superior. Los tumores con grado 2 se localizaron por igual en las tres localizaciones.

Se comprobó una tendencia lineal creciente entre el grado nuclear y el tamaño tumoral ( $p<0,0001$ ), de manera que el 70% de los tumores de grado 4 eran mayores de 7 cm y no hubo ningún tumor menor de 4 cm con grado 4. De igual manera, el 50% de los tumores de grado 1 eran menores de 4 cm, por tan sólo un 12,5% de grado 1 dentro de los tumores mayores de 7 cm.

El grado nuclear también presentó una relación estadísticamente significativa ( $p<0,0001$ ) con los distintos motivos de consulta: el 87,5% de los tumores de grado 1 fueron diagnosticados incidentalmente, mientras que todos los pacientes con tumores de grado 4 presentaron algún tipo de sintomatología (**Figura 20**).

El grado nuclear y el tipo de cirugía practicada presentaron relación estadísticamente significativa ( $p=0,012$ ). Un 37,5% de los tumores de grado 1 y un 36% de los de grado 2 fueron sometidos a cirugía conservadora, mientras que la cirugía radical fue la practicada en la mayoría de los tumores de grado 3 y 4 (94,5 y 80% respectivamente). A ningún paciente con tumor de grado 4 se le realizó cirugía conservadora ya que el 20% restante de los tumores de grado 4 corresponden a casos que se consideraron inoperables.



*Figura 20: Grado nuclear y motivo de consulta*

#### 4.2.5.3 Estadío tumoral primario (pT).

Las distintas frecuencias de estadios pT según la clasificación TNM para los tumores se muestran en la **Tabla 10**. El estadio pT1 fue la forma de presentación más frecuente de los tumores del estudio (57,3%).

El estadio pT se relacionó con la localización tumoral, de forma que los tumores en estadios más avanzados se localizaron a nivel mesorrenal en mayor proporción ( $p=0,004$ ) (**Tabla 12**)

**Tabla 12:** Distribución de estadios pT según, motivo de consulta, localización del tumor, tipo de cirugía y grado nuclear de Fuhrman

	pT1 n (%)	pT2 n (%)	pT3 n (%)	pT4 n (%)
<b>Motivo de consulta</b>				
Masa abdominal	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,5)	1 (25,0)
Hematuria	8 (15,7)	4 (25)	5 (27,8)	1 (25,0)
Dolor	4 (7,8)	2 (12,5)	3 (16,7)	1 (25,0)
Incidental	35 (68,7)	9 (56,3)	4 (22,2)	0 (0,0)
Otros	4 (7,8)	1 (6,3)	5 (27,8)	1 (25,0)
<b>Localización del tumor</b>				
Mesorrenal	15 (29,8)	10 (62,5)	14 (77,8)	3 (75,0)
Polo superior	18 (35,6)	3 (18,8)	3 (16,7)	0 (0,0)
Polo inferior	18 (35,6)	3 (18,8)	4 (22,3)	1 (25,0)
<b>Tipo de cirugía</b>				
Nefrectomía radical abdominal	4 (7,8)	9 (56,3)	8 (44,5)	2 (50,0)
Nefrectomía radical lumbar	27 (59,4)	5 (31,3)	10 (55,5)	0 (0,0)
Nefrectomía parcial	20 (39,2)	2 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
Inoperable	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (50,0)
<b>Grado nuclear</b>				
Grado 1	7 (13,7)	1 (6,7)	0 (0,0)	0 (0,0)
Grado 2	36 (70,6)	8 (53,3)	6 (33,3)	0 (0,0)
Grado 3	5 (9,8)	5 (33,3)	6 (33,3)	2 (50,0)
Grado 4	2 (3,9)	1 (6,7)	5 (27,8)	2 (50,0)
Inclasificable	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,5)	0 (0,0)

El estadio pT también se relacionó con el motivo de consulta ( $p=0,022$ ). El 68,7% y el 56,3% de los tumores con estadios más precoces (pT1 y pT2 respectivamente) fueron diagnosticados de manera incidental, mientras que tan solo un 22,2% de los pT3, y ninguno de los pT4, se diagnosticaron por este motivo (**Tabla 12**).

Como era de esperar, el tipo de cirugía fue radical en todos los casos de tumores en estadio pT3 y pT4, aunque en este último caso hubo dos pacientes que se consideraron inoperables. El 39,2% de los tumores en estadio pT1 fueron sometidos a cirugías conservadoras (**Tabla 12**).

Aunque el estadio pT no mostró asociación con el tipo histológico del tumor, sí lo hizo con el grado nuclear de Fuhrman ( $p=0,001$ ). De manera que los grados nucleares más altos (3 y 4) aparecieron en tumores con estadios más avanzados, y los tumores con estadios pT1 y pT2 presentaron mayoritariamente grados 1 ó 2 (**Tabla 12**).

#### **4.2.5.4 Estadio de afectación ganglionar regional (pN).**

Dado que en la mayoría de casos no se realizó una linfadenectomía, el 73% de los pacientes fueron clasificados como en estadio pNx, es decir, no fue posible la evaluación de los ganglios linfáticos regionales.

Se evaluó la afectación ganglionar en 24 casos (27%), de los cuales en 18 (20,2%) el resultado fue negativo siendo clasificados como en estadio pN0. En los 6 pacientes restantes se objetivó afectación de uno o más ganglios linfáticos regionales (estadios pN1 o pN2). Para el análisis estadístico se consideró como pN- el estadio pN0, y como pN+ los estadios pN1 y pN2 (**Tabla 13**).

Todos los tumores pN+ presentaron localización mesorrenal. Únicamente dos pacientes con CRCC tuvieron ganglios afectados, correspondiendo los cuatro casos restantes de pacientes con metástasis linfáticas a carcinomas renales de tipo sarcomatoide ( $p<0,0001$ ).

La presencia de afectación ganglionar mostró relación estadísticamente significativa con el grado de diferenciación nuclear ( $p=0,004$ ), de manera que ningún tumor pN+ presentó grado nuclear bajo (1 ó 2), tal y como se muestra en **Tabla 13**.

Igualmente, resultó estadísticamente significativa ( $p=0,006$ ) la asociación entre estadio pT y pN, de manera que de los tumores con evaluación del estadio ganglionar, el 100% del los pT4 eran pN+ y ninguno de los pT1 presentaron metástasis linfáticas (**Tabla 13**).

**Tabla 13:** Distribución de estadios pN según estadio pT y grado nuclear de Fuhrman

	pN- n (%)	pN+ n (%)
<b>Estadio pT</b>		
pT1	10 (55,5)	0 (0,0)
PT2	5 (27,8)	1 (16,7)
PT3	3 (16,7)	3 (50,0)
PT4	0 (0,0)	2 (33,3)
<b>Grado nuclear</b>		
Grado 1	3 (18,8)	0 (0,0)
Grado 2	7 (43,8)	0 (0,0)
Grado 3	2 (12,5)	2 (33,3)
Grado 4	3 (18,8)	4 (66,7)
Inclasificable	1 (6,3)	0 (0,0)

#### **4.2.5.5 Presencia de metástasis a distancia (pM).**

Presentaron metástasis a distancia 15 casos (16,9%). En un paciente no fue posible la evaluación de la presencia o ausencia de metástasis a distancia, y en el resto (82%) no se hallaron. La presencia de metástasis a distancia se relacionó con el motivo de consulta ( $p=0,013$ ). La hematuria fue el motivo de consulta más frecuente entre los pacientes que presentaban metástasis a distancia (pM+), mientras que en los casos en los que el hallazgo del tumor fue incidental, tan solo dos fueron pM+. Los porcentajes de síntomas de inicio según presencia de metástasis a distancia se muestran en la **Tabla 14**. De igual forma, la presencia o ausencia de metástasis a distancia se relacionó estadísticamente con el grado nuclear de Fuhrman ( $p<0,0001$ ) ya que los pacientes con metástasis a distancia presentaron un grado nuclear más avanzado que los libres de metástasis. Ningún tumor de grado 1 presentó estadios pM+ (**Tabla 14**).

Finalmente, los estadios pT y pM presentaron asociación estadísticamente significativa al igual que los pN y pM ( $p<0,0001$  para ambos casos). Los datos se exponen en la **Tabla 14**.

**Tabla 14:** Distribución de estadios pM según motivo de consulta, grado nuclear de Fuhrman y estadios pT y pN

	pM- n (%)	pM+ n (%)
<b>Motivo de consulta</b>		
Masa abdominal	1 (1,4)	1 (6,7)
Hematuria	13 (17,8)	5 (33,3)
Dolor	7 (9,6)	2 (13,3)
Incidental	46 (63,0)	2 (13,3)
Otros	6 (8,2)	5 (33,3)
<b>Grado nuclear</b>		
Grado 1	7 (9,8)	1 (6,7)
Grado 2	48 (67,6)	2 (13,3)
Grado 3	11 (15,5)	7 (46,7)
Grado 4	4 (5,6)	5 (33,3)
Inclasificable	1 (1,4)	0 (0,0)
<b>Estadio pT</b>		
pT1	35 (55,5)	5 (33,3)
pT3	15 (23,8)	1 (6,7)
pT3	12 (19,1)	6 (40)
PT4	1 (1,6)	3 (20)
<b>Estadio pN</b>		
pN-	18 (100,0)	0 (0,0)
pN+	0 (0,0)	6 (100,0)

#### 4.2.5.6 Estadio TNM y asociación con otros tumores.

Un 58,2% de los pacientes del estudio presentaron estadio I de la clasificación TNM (47 casos).

Seis pacientes (6,7%) presentaron asociación sincrónica o metacrónica con otro tipo de tumores.



### 4.3 ANÁLISIS DE SECUENCIAS MICROSATÉLITE

El estudio de secuencias microsatélite en muestras tumorales permite evaluar el grado de inestabilidad genómica que poseen, permitiendo además clasificarla en dos tipos: inestabilidad de microsatélites (MSI), y pérdida de heterocigosidad (LOH). Ambos tipos de inestabilidad se diferencian en las causas que las provocan y ponen de manifiesto dos mecanismos distintos de adquisición de mutaciones.

**Inestabilidad de microsatélites:** El Análisis tanto del ADN tumoral como del ADN procedente de tejido sano de los 89 pacientes de nuestro estudio no reveló la presencia de inestabilidad en ninguno de los 5 microsatélites del panel de Bethesda <sup>112</sup>, ni tampoco en los 2 microsatélites localizados en las regiones exónicas de los genes *TGFβrII* y *BAX*. Estos resultados permiten descartar este tipo de inestabilidad en casos de carcinoma de células renales esporádico en la población analizada, y además nos indican que no existe una relación directa entre el Síndrome de Lynch y este tipo tumoral.

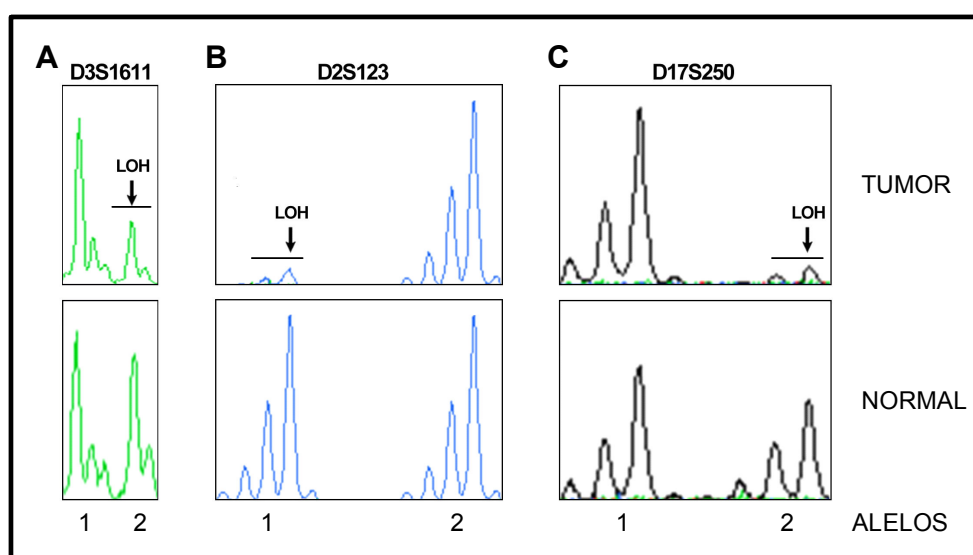
**Pérdida de heterocigosidad:** Aunque el panel de marcadores microsatélites utilizado en este estudio está optimizado para detectar MSI, también nos permitió detectar LOH en algunas regiones cromosómicas. Para poder analizar la pérdida de heterocigosidad son necesarios dos requisitos:

a) El individuo estudiado debe ser heterocigoto en cuanto a la longitud del microsatélite, de forma que sólo los heterocigotos son informativos. Los microsatélites BAT-25 y BAT-26 son monomórficos, todos los pacientes presentaron un solo alelo con la misma longitud, y por tanto no pudieron usarse para el estudio de LOH. Los microsatélites exónicos de los genes *TGFβrII* y *BAX* tampoco pueden usarse para el

estudio de LOH, porque al ser codificantes, no admiten variaciones polimórficas en su longitud. Los únicos microsatélites que se mostraron informativos por poseer varios alelos de distinto tamaño fueron D5S346, D3S1611, D2S123 y D17S250.

b) Otro de los requisitos para poder detectar LOH, es disponer de ADN procedente de tejido sano del mismo individuo para poder realizar una comparación entre ADN tumoral y procedente de tejido sano. Al realizar dicha comparación se observó que un alto porcentaje de los tumores había perdido uno de los alelos, indicando que se había perdido el fragmento de material genético que contenía en su interior el microsatélite estudiado.

De los cuatro marcadores microsatélites que se revelaron como informativos sólo se detectó LOH en tres de ellos: D3S1611, D2S123 y D17S250. En la **figura 21** se muestran ejemplos de pérdida de heterocigosidad para dichos marcadores detectados en nuestros pacientes de estudio.



**Figura 21: Ejemplos de pérdida de heterocigosidad en los pacientes del estudio.** Los sujetos A) N51, B) N29 y C) N81 son heterocigotos para los microsatélites estudiados (presentan 2 alelos, los cuales difieren en su tamaño). En el tejido tumoral se puede apreciar que uno de los alelos se ha perdido cuando hacemos la comparación con tejido normal del mismo paciente.

El fenómeno de LOH fue frecuente sobre todo a nivel del microsatélite D3S1611 que aconteció en el 34,9%, (15/43) seguido del microsatélite D2S123 en un 7,5% (4/53) y del D17S250 con un 5,6% (4/72). En el marcador microsatélite D5S346 no se detectó LOH en ninguno de los casos. (**Tabla 15**).

**Tabla 15:** Porcentaje de LOH en los casos informativos

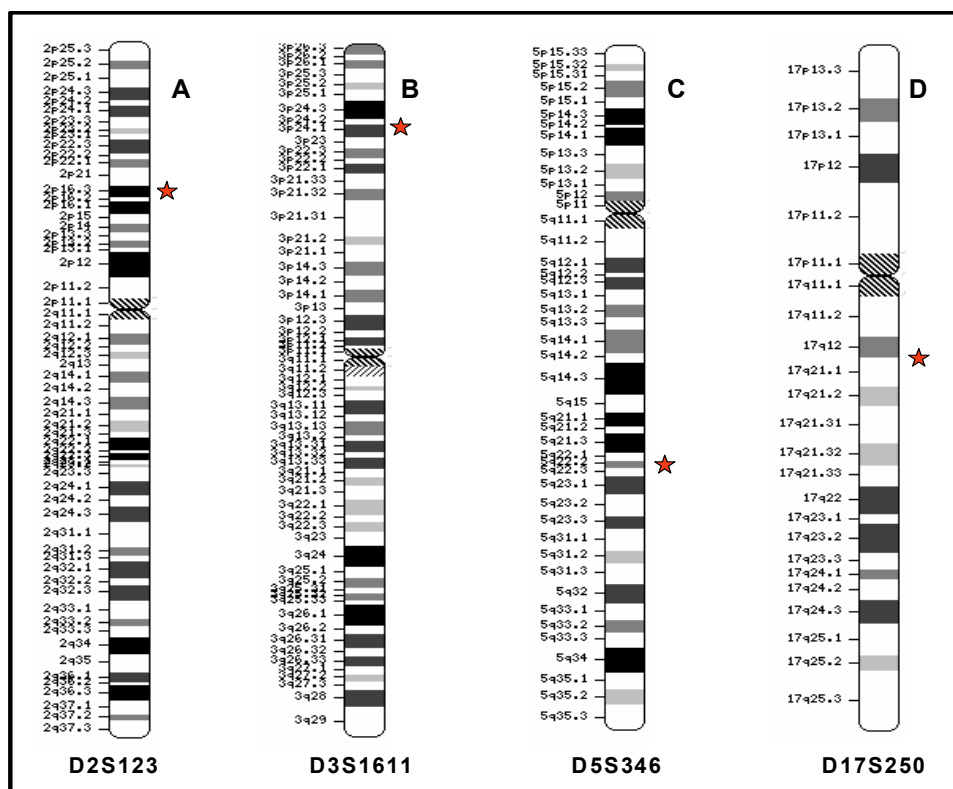
Microsatélite	Nº de casos con LOH	Nº de casos informativos	% corregido
D3S1611	15	43	34,9
D2S123	4	53	7,5
D17S250	4	72	5,6
D5S346	0	71	0

Estos resultados nos indican que la inestabilidad cromosómica que afecta a grandes fragmentos de material genético parece ser la principal alteración genética que caracteriza a este tipo tumoral en nuestra población. También se deduce que las pérdidas de material genético no parecen ser algo aleatorio, sino más bien específico y característico del tipo tumoral. Ésta es la explicación de que la región 3p (donde se localiza el marcador D3S1611) presente un alto porcentaje (34,9%) de pérdida de heterocigosidad en cáncer renal de células claras, y sin embargo no hayamos encontrado ningún caso de pérdida de heterocigosidad en la región 5q22 (donde se localiza el marcador D5S346). Cuando se analizó la LOH según el subtipo histológico se observó que fue el carcinoma renal de células claras el que manifestó pérdidas en el microsatélite D3S1611 más frecuentemente (46,4%). (**Tabla 16**).

**TABLA 16:** Distribución de LOH según microsatélite analizado y tipo histológico del tumor

	<b>D3S1611</b>	<b>D17S250</b>	<b>D2S123</b>
	<b>n (%)*</b>	<b>n (%)*</b>	<b>n (%)*</b>
CCR células claras	13(46,4)	1(2,17)	2(5,8)
CCR papilar	1(20,0)	1(10,0)	0
CCR cromóforo	0	2(40,0)	2(50,0)
CCR sarcomatoide	1(50,0)	0	0

El estudio de estos cuatro microsatélites sólo nos informó de una pequeña fracción del genoma. El D2S123 se sitúa en brazo corto del cromosoma 2, el D3S1611 en el brazo corto del cromosoma 3, el D17S250 en el brazo corto del cromosoma 17 y el D5S346 en el brazo largo del cromosoma 5 (**Figura 22**). Pese a ello encontramos LOH en 23 de los 89 tumores, lo cual da idea de la alta frecuencia con la que ocurren aberraciones cromosómicas en este tipo tumoral.



**Figura 22:** Localización de los microsatélites D2S123, D3S1611, D5S346 y D17S250. La estrella roja marca la localización del microsatélite en sus respectivos cromosomas: A) cromosoma 2, B) cromosoma 3, C) cromosoma 5 y D) cromosoma 17.

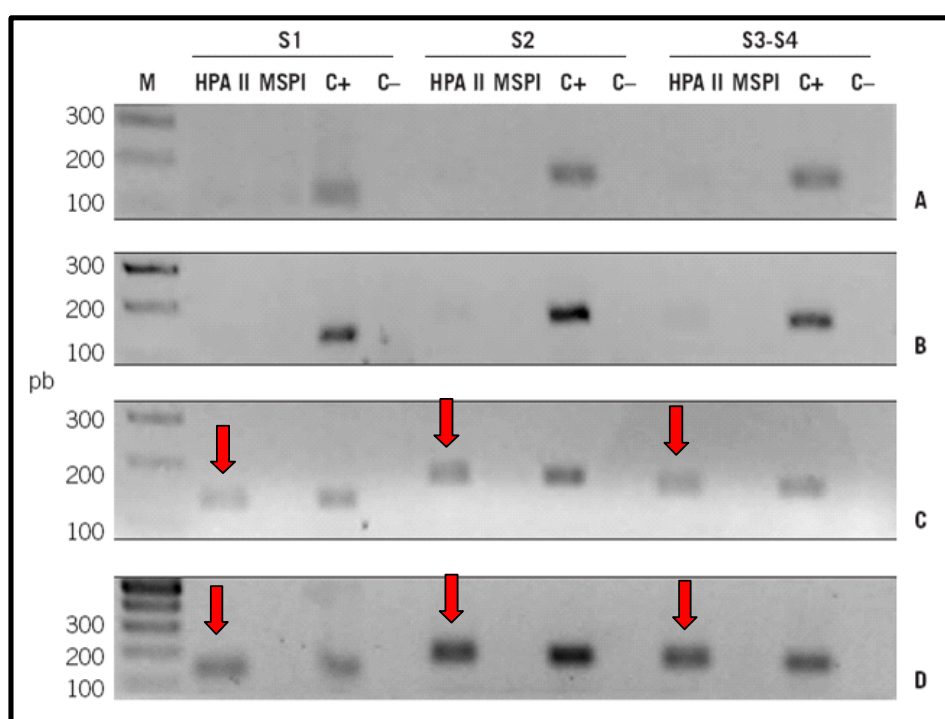
## 4.4 ANÁLISIS DE HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *hMLH1*

Está demostrado que el silenciamiento epigenético mediante metilación de la región promotora es una forma común de bloquear la expresión del gen *hMLH1* en varios tipos tumorales esporádicos<sup>106-108</sup>. Por ello se decidió en el presente estudio llevar a cabo este análisis en nuestro grupo de pacientes.

Como se indicó en el capítulo de material y métodos, el análisis de metilación se llevó a cabo mediante el empleo de enzimas de restricción sensibles a metilación. Para validar la técnica se empleó ADN metilado procedente de dos fuentes distintas: metilación enzimática, y procedente de la línea celular HEK293T. Al realizar el análisis de metilación del promotor del gen *hMLH1* sólo obtuvimos una clara amplificación tras digerir con la enzima *HpaII* en controles positivos. La intensidad de esta banda amplificada era igual que la del control sin digerir, de lo cual se deduce que el 100% del ADN se encuentra metilado en las posiciones estudiadas. El uso de estos controles nos permite tener la seguridad de que la metodología empleada es adecuada para la detección de metilación.

Una vez validada la técnica se procedió al estudio del ADN tumoral de las muestras de nuestro estudio. En ninguna de las 89 muestras analizadas se detectó un grado de amplificación similar al del control positivo de metilación (C+) cuando se usaba como molde ADN digerido previamente con la enzima *HpaII*. Este resultado es indicativo de una ausencia de metilación. En la **Figura 20** se muestran cuatro geles representativos de las muestras analizadas. El gel **A** corresponde a uno de los tumores

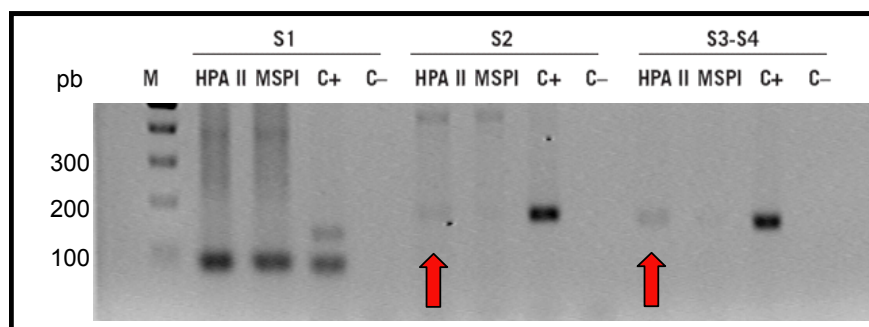
analizados. El gel **B** corresponde a ADN sanguíneo procedente de un individuo sano. El gel **C** corresponde a ADN tratado con metilasa, y el **D** a ADN procedente de la línea celular HEK293T. Con flechas rojas se indican las bandas de amplificación obtenidas al usar como molde ADN digerido con la enzima *HpaII*, indicando la presencia de metilación. Esta banda sólo se obtuvo en los controles positivos de metilación (geles **C** y **D**), estando ausente tanto en los controles negativos como en las muestras de ADN tumoral del estudio.



**Figura 23: Análisis del estado de metilación del promotor del gen *hMLH1*.** Se indica en cada calle del gel la enzima con la que se digirió el ADN molde. El control positivo (C+) de la reacción de PCR se realizó con ADN sin digerir, y el control negativo (C-) no incluyó ADN. El gel A fue obtenido a partir de uno de los tumores analizados en este estudio. El gel B corresponde a sangre de un individuo sano y representa un control negativo de metilación. Como controles positivos de metilación se utilizaron ADN previamente metilado con la enzima *HpaII* metilasa (C) y ADN de la línea celular HEK293T, en la cual el promotor del gen *hMLH1* se encuentra inactivado por metilación (D). M: marcador de tamaño molecular; pb: pares de bases.

En 12 de las muestras analizadas (13,5%) se observaron productos de amplificación de intensidad moderada al digerir el ADN con la enzima *HpaII*. Estos resultados podrían indicar la existencia de metilación en uno solo de los alelos del gen,

o a la existencia en el tumor de una subpoblación de células en las que el promotor se encuentre metilado. Estos casos no presentaron ninguna característica anatomopatológica distinta al resto (**Figura 24**).



**Figura 24:** Ejemplo representativo de los tumores susceptibles de hemimetilación, que mostraron producto de amplificación en la calle donde se había utilizado ADN digerido con la enzima *HpaII* (flecha roja).

Para poder concluir si se trataba de metilación monoalélica se realizó un análisis densitométrico de estas bandas para conocer la cantidad de producto de amplificación obtenido. Para ello se analizó la intensidad de la banda obtenida tras utilizar ADN digerido con la enzima *HpaII*, y se comparó con la intensidad de su control positivo de ADN sin digerir (la formula de detalla en el apartado de materiales y métodos como **tabla 6**). La existencia de metilación monoalélica originaría que la intensidad de la banda obtenida ADN digerido fuera del 50% respecto a la intensidad de la banda obtenida a partir de ADN sin digerir. Este porcentaje no se alcanzó en ninguna de las muestras, encontrándose la media en 12,8%. Por lo cual se descartó que esa amplificación se debiera a una metilación monoalélica, atribuyéndose a una digestión enzimática incompleta por parte de la enzima *HpaII*. Los resultados del análisis densitométrico se muestran en la **tabla 17**, donde aparecen los dos controles de ADN no metilado, el control de ADN metilado, los tumores sospechosos de presentar metilación parcial y el fragmento en el que se detecto la posible metilación.

Puesto que en nuestras 89 muestras no encontramos ningún caso positivo de metilación, estos resultados indican que dicho fenómeno no juega un papel significativo en el desarrollo de este tipo tumoral en la población analizada.

**Tabla 17: Resultados del análisis densitométrico**

	Fragmento	fondo	HpaII	C+	HpaII-fondo	C+-fondo	Hpa/C+ %
<b>Control negativo 1</b>	2	429	438	552	9	123	7%
	3	400	418	509	18	109	16%
<b>Control negativo 2</b>	2	130	131	268	1	138	0.7%
	3	115	129	220	14	105	13%
<b>Control metilado</b>	1	285	331	343	46	58	79%
	2	375	425	468	50	93	54%
	3	334	383	385	49	51	96%
<b>N5</b>	2	283	308	433	25	150	17%
	3	285	306	380	21	95	22%
<b>N13</b>	2	175	184	280	9	280	9%
	3	160	170	224	10	64	16%
<b>N19</b>	2	301	302	599	1	198	0,5%
	3	310	329	438	19	128	15%
<b>N21</b>	1	326	361	534	35	208	17%
	2	237	254	353	17	116	15%
<b>N32</b>	2	267	282	403	15	136	11%
	3	280	296	407	16	127	13%
<b>N42</b>	2	207	214	509	7	302	2%
	3	130	140	326	10	196	5%
<b>N46</b>	2	463	461	611	0	148	0%
	3	397	422	544	25	147	17%
<b>N50</b>	2	210	215	398	5	188	3%
	3	244	256	441	12	197	6%
<b>N51</b>	2	89	95	187	6	98	6%
	3	80	89	174	9	94	10%
<b>N55</b>	2	180	190	371	10	191	5%
	3	181	203	377	22	196	11%
<b>N80</b>	2	302	313	468	11	166	7%
	3	190	201	271	11	81	14%
<b>N81</b>	2	225	229	311	4	86	5%
	3	178	185	247	7	69	10%



## 4.5 ANÁLISIS DE MUTACIONES EN LOS GENES *hMLH1* Y *hMSH2*

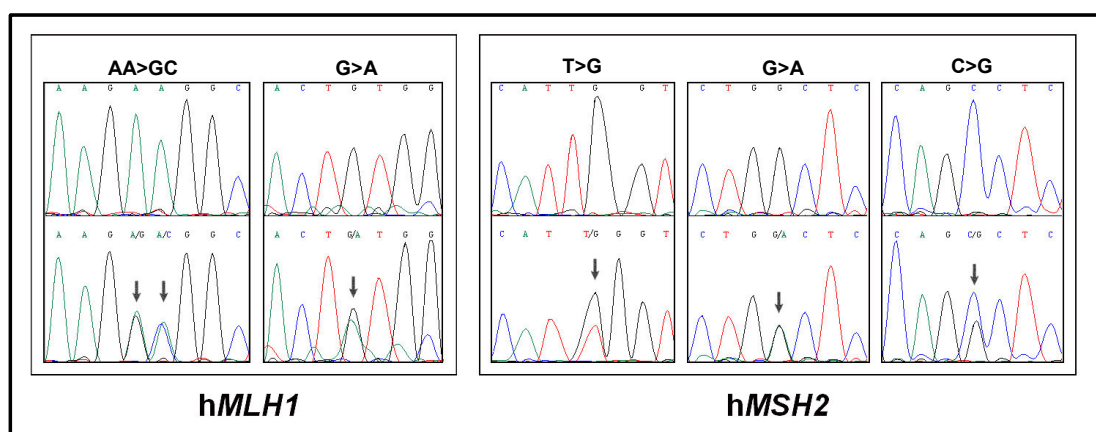
Para la realización de este estudio se evaluaron diferentes técnicas, unas basadas en la electroforesis en geles de poliacrilamida como SSCP, TTGE y DGGE, y por otro lado la secuenciación automática. Las primeras tienen la ventaja de la rapidez y economía. La segunda es más costosa y cara, pero proporciona una información mas completa. Tras valorar todas nos decidimos por la secuenciación directa. El estudio comenzó con el diseño de cebadores para los 19 exones del gen *hMLH1* y los 16 del gen *hMSH2*, y posteriormente se pusieron a punto las condiciones de amplificación. El análisis de los 19 exones de *hMLH1* y 16 de *hMSH2* permitió detectar un total de 8 (9,0%) pacientes de CCR con alteraciones de secuencia en los genes MMR estudiados. Todas las mutaciones detectadas en este estudio estaban en heterocigosis, implicaban un cambio de aminoácido en el ADN tumoral y aparecieron en carcinomas renales de células claras. Todos estos cambios nucleotídicos fueron confirmados mediante la secuenciación del amplicón en sentido opuesto. Además, se realizó la secuenciación de ADN procedente de tejido renal sano del mismo paciente para determinar si las mutaciones eran constitutivas o somáticas. Todas fueron detectadas también en ADN procedente de tejido sano, concluyéndose por tanto que eran constitutivas. Tres enfermos (3,7%) presentaron mutaciones en el gen *hMLH1* y cinco (5,6%) en el gen *hMSH2*. Un paciente presentó dos mutaciones en el exón 6 del gen *hMSH2* (G322D y P349A). La mutación P349A en el gen *hMSH2*, ha sido descrita por primera vez en este trabajo. En la **Tabla 18** se detallan las características de las mutaciones encontradas, así como las características anatomopatológicas y clínicas.

**Tabla 18:** Cambios encontrados en los genes *hMLH1* y *hMSH2*, localización y características clínicas y anatómicas patológicas

A) Pacientes con carcinoma de células renales esporádico							
Gen	Paciente	Mutación (DNA/proteína)	Exón	Edad	Sexo	pTNM	Estadio TNM
<b>hMLH1</b>	N30	c.1912-1913 (AA>GC) (K618A)	16	75	F	pT1a, pN0, pM0	I
	N49	c.1912-1913 (AA>GC) (K618A)	16	73	F	pT4, pN1, pMx	IV
	N81	c.2206 (G>A) (V716M)	19	60	M	pT1b, pN0, pM0	I
<b>hMSH2</b>	N33	c.1033 (G>A) (G322D)	6	74	M	pT2, pNx, pM0	II
	N40	c.1033 (G>A) (G322D)	6	75	M	pT1b, pN0, pM0	I
	N71	c.503 (T>G) (I145M)	3	52	M	pT1b, pNx, pM0	I
	N63	c.1033 (G>A) (G322D)	6	63	M	pT1b, pN0, pM0	I
	N97	c.1113 (C>G) (P349A)	6	63	M	pT1b, pNx, pM0	I
B) Sujetos del grupo control							
Gen	Sujeto	Mutación (DNA/proteína)	Exón	Edad	Sexo		
<b>hMLH1</b>	C72	c.1913 A>G (K618R)	16	60	M		
	C79	c.1912-1913 AA>GC (K618A)	16	66	M		
	C95	c.1912-1913 AA>GC (K618A)	16	47	M		
	C96	c.1912-1913 AA>GC (K618A)	16	58	M		
<b>hMSH2</b>	C31	c.1033 G>A (G322D)	6	67	M		
	C97	c.1033 G>A (G322D)	6	58	M		

\*AP: Antecedentes personales.  
AF: Antecedentes familiares.

Cabe destacar que dos pacientes presentaron la mutación c.1912-1913 AA>GC en el gen *hMLH1* implicando a dos bases consecutivas y que se traduce en un cambio de aminoácido lisina>alanina (K618A), y otros cuatro pacientes eran portadores de la mutación c.1033 G>A en el gen *hMSH2* que se traduce en un cambio de aminoácido glicina>aspártico (G322D). La edad media de los pacientes con CCR que presentaron mutaciones fue de 66,9 años, similar a la de los no portadores de alteraciones en estos genes. Ningún paciente con mutación en los genes MMR presentó fenómenos de LOH. En la **figura 25** se muestran los electroforetogramas obtenidos al analizar las secuencias donde se aprecian las mutaciones detectadas.

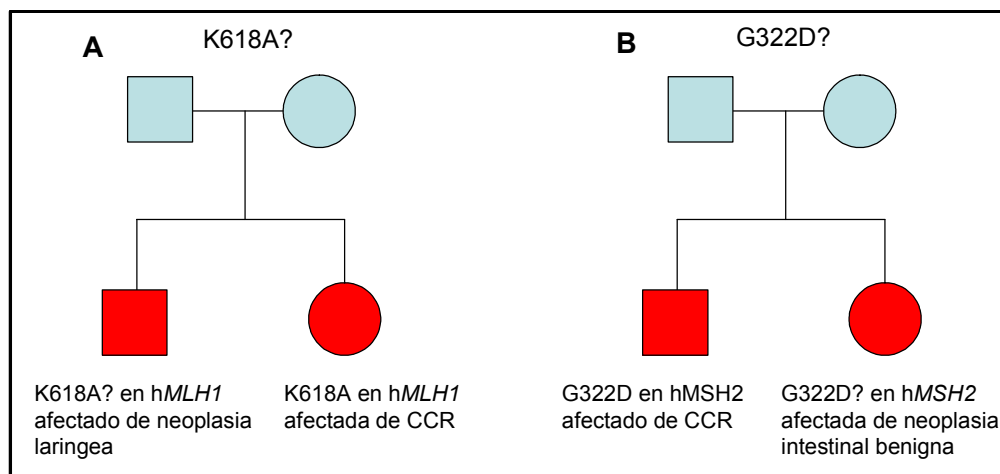


**Figura 25: mutaciones encontradas en los pacientes de CCR.** En la parte superior se indican las bases que cambian. En la inferior el gen donde se localizan. En los electroforetogramas se muestra una comparación de una secuencia normal (arriba) con otra portadora de mutación e indicadas por las flechas. (Abajo).

Debido a que las mutaciones K618A y G322D fueron detectadas en más de un paciente (dos y cuatro respectivamente) cabía la posibilidad de que pudieran estar relacionadas con el desarrollo del cáncer renal, o bien que fuesen polimorfismos sin relación con la enfermedad. Con el fin de conocer la naturaleza de las mutaciones K618A y G322D se realizó la secuenciación de los exones 16 de *hMLH1* y 6 de *hMSH2* (donde se localizan respectivamente dichas mutaciones) en un total de 95 sujetos control, del mismo ámbito geográfico y con edad similar, en los cuales se había

descartado cualquier tipo de enfermedad oncológica previa. La mutación K618A del gen *hMLH1* se detectó en tres (3,2%) de los controles analizados, y la G322D del gen *hMSH2* en dos (2,1%) de ellas. Puesto que no hay diferencias estadísticamente significativas entre controles y enfermos, y que en ambos grupos las mutaciones aparecen en un porcentaje mayor al 1%, los datos sugieren que dichas variaciones de secuencias podrían responder a cambios de naturaleza polimórfica, haciendo por tanto difícil relacionar la génesis del tumor con dichos cambios en la secuencia. El estudio realizado en el grupo control permitió detectar además el cambio K618R en el gen *hMLH1*, mutación que no había sido descrita previamente ni en pacientes ni en controles. La edad media de los controles que presentaron cambios en los genes MMR estudiados fue 59,3 años.

El análisis de los antecedentes familiares y personales de los pacientes permitió determinar que de los enfermos portadores de mutaciones, dos de ellos tenían antecedentes familiares oncológicos: la paciente N30 con la mutación K618A en el gen *hMLH1* (hermano con neoplasia laríngea) y el enfermo N40 con mutación G322D en el gen *hMSH2* (hermana con antecedentes de cirugía por tumoración intestinal benigna no especificada). Estos mismos enfermos tenían antecedentes personales de otro tipo de neoplasias: la paciente N30 con un carcinoma ductal de mama y tumor de endometrio; y el enfermo N40 con antecedente de una gammopatía monoclonal IgG con cadenas ligeras Lambda. Este resultado podría estar indicando la presencia de una predisposición genética a padecer cáncer en las familias de los portadores de mutaciones en los genes MMR. Se intentó estudiar la segregación de estas mutaciones con la enfermedad en las familias afectadas, pero no fue posible por falta de muestras y de las historias clínicas. En la **figura 26** se representan los árboles filogenéticos de las familias de los enfermos con la información de que se dispone.



**Figura 26: Árboles filogenéticos de los dos enfermos de CCR portadores de mutación con antecedentes familiares de cáncer.** A) La portadora de la mutación K618A en el gen hMLH1 tenía un hermano con una neoplasia laríngea. B) El portador de la mutación G322D tenía una hermana afectada de neoplasia intestinal benigna.

Además de las mutaciones mostradas anteriormente también se detectaron mutaciones silenciosas en dos de los pacientes. Una en el gen hMLH1 en la posición c.435 A>G (A125A), y otra en el gen hMSH2 en la posición c.1556 A>G (L496L), las cuales no provocan un cambio de aminoácido. Igualmente durante el estudio de estos genes se detectaron varios polimorfismos tanto exónicos como intrónicos, cuyas frecuencias genotípicas se detallan en la **Tabla 19**. Se compararon con las frecuencias de los mismos polimorfismos descritas, bien en población europea (cuando había datos de la misma), o en población global. No se aprecian diferencias significativas entre los datos obtenidos en nuestro estudio comparados con los descritos en las bases de datos. Los datos de las frecuencias descritas se obtuvieron de la página del NCBI (National Center for Biotechnology information).

**Tabla 19:** Localización y frecuencias genotípicas de los polimorfismos hallados en los genes *hMLH1* y *hMSH2*

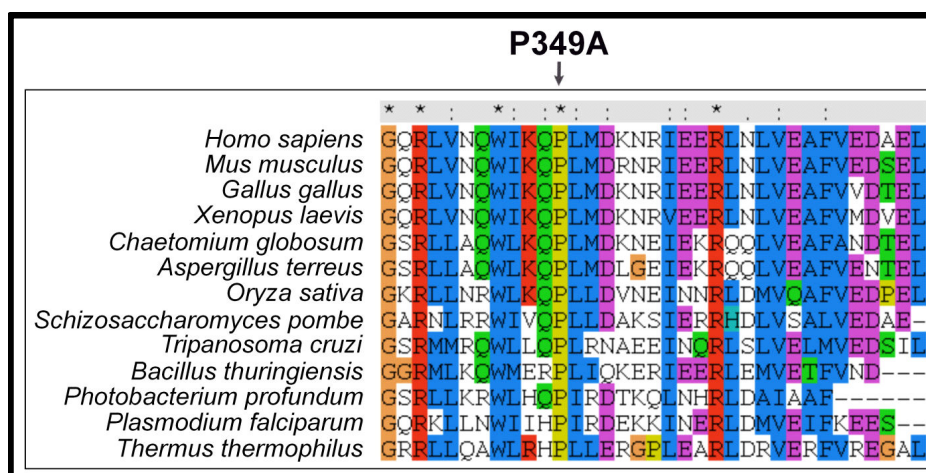
	localización	Posición	Frec. genotípica en pacientes	Frec. genotípica descrita	
<b>hMLH1</b>	Exón 8	g.18589 (1219V)	AG = 0,41 AA = 0,37 GG = 0,22	Población europea	AG = 0,42 AA = 0,45 GG = 0,13
	Intrón 14	g.48761	AG= 0,44 GG= 0,30 AA= 0,26	Población europea	AG = 0,43 GG = 0,28 AA = 0,28
<b>hMSH2</b>	Intrón 1	g.288	CC = 0,54 CG = 0,28 GG = 0,18	Población global	CC = 0,20 CG = 0,47 GG = 0,33
	Intrón 6	g.26608	TT = 0,93 TC = 0,06 CC = 0,01	Población global	TT = 0,99 TC = 0,01 CC = 0,00
	Intrón 9	g.63525	AA = 0,76 AT = 0,22 TT = 0,02	Población global	AA = 0,66 AT = 0,34 TT = 0,00
	Intrón 10	g.63697	GA = 0,48 GG = 0,43 AA = 0,09	Población europea	GA = 0,42 GG = 0,45 AA = 0,13
	Intrón 12	g.73237	TT = 0,74 TC = 0,22 CC = 0,03	Población europea	TT = 0,78 TC = 0,22 CC = 0,00

## **4.6 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS.**

El alineamiento de secuencias de aminoácidos nos permite valorar cual es el grado de conservación de éstas entre distintas especies. Un grado de conservación alto nos indica que esa región debe jugar un papel importante para la función de la proteína, y generalmente cualquier variación provocará una alteración de su función. Regiones con menor importancia funcional admiten un número mayor de variaciones sin que cambie sustancialmente la actividad de la proteína. El alineamiento de secuencias de aminoácidos permite predecir de forma indirecta el grado de patogenicidad de las mutaciones detectadas.

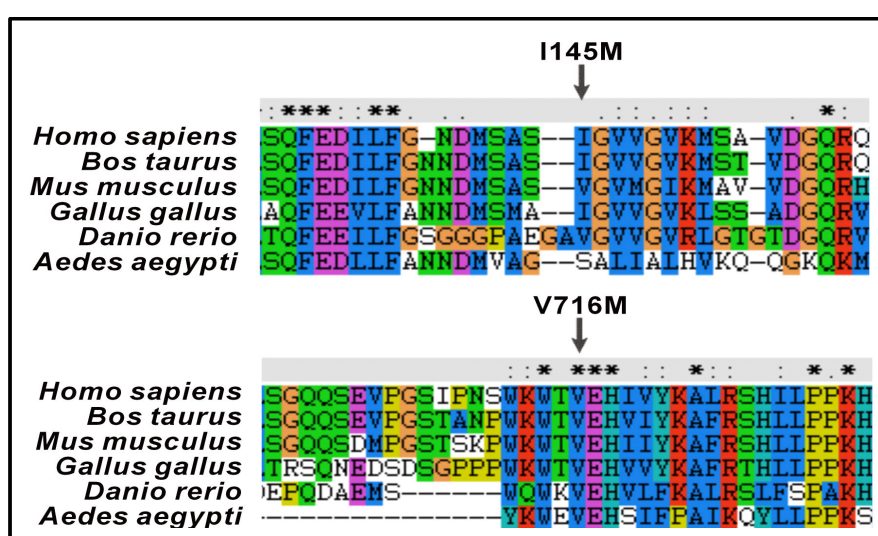
Para realizar este estudio se utilizó el programa informático Clustal W, y las secuencias de aminoácidos fueron obtenidas de la página del NCBI.

En la comparación de secuencias realizado para la mutación P349A (no descrita anteriormente), se aprecia una conservación total en todas las especies de las cuales hemos obtenido secuencia, incluyendo grupos tan alejados como mamíferos, plantas, levaduras y bacterias. Esto indica que debe ser un aminoácido importante para la función de la proteína. Además, debido a la estructura del aminoácido prolina, se sabe que es capaz de provocar un giro en la cadena polipeptídica que rompe la estructura secundaria de la misma, y cualquier cambio que implique a este aminoácido tendrá graves consecuencias estructurales para la proteína. **(Figura 27).**



**Figura 27:** Comparación de secuencias de aminoácidos para la mutación P349A de la proteína hMSH2 entre humanos y otras especies. La mutación P349A es descrita por primera vez en este estudio.

Este mismo estudio lo hemos realizado para las mutaciones V716M en el gen hMLH1, y I145M del gen hMSH2. En estos casos los aminoácidos afectados también muestran un alto grado de conservación, el aminoácido 716 del gen hMLH1 es valina en todas las especies estudiadas, mientras que el aminoácido 145 es Isoleucina, o bien valina en algunas especies, aminoácidos ambos que comparten características físico-químicas similares. (Figura 28).



**Figura 28:** Comparación de secuencias de aminoácidos de las mutaciones no polimórficas I145M en el gen hMSH2 y V716M en el gen hMLH1.



Además de estudios de análisis de secuencias de aminoácidos para valorar el grado de conservación evolutivo es posible plantear otros estudios que atienden a las características físico-químicas de los aminoácidos implicados en las mutaciones. En la **figura 29** se detallan algunas de estas características, como pueden ser la polaridad y la carga. A continuación se detallan el tipo de cambio encontrado y las propiedades físico-químicas de los mismos.

Cambio K618A: El aminoácido Lisina (K) tiene características básicas, y a pH fisiológico presenta carga +, es sustituido por el aminoácido Alanina (A), de naturaleza apolar, por tanto sin carga y con una cadena lateral mucho mas corta.

Cambio G322D: El aminoácido Glicina (G) es polar, no tiene carga no presenta cadena lateral, es el aminoácido con el tamaño mas pequeño que existe, es sustituido por Aspártico (D), de carácter ácido y que presenta carga – a pH fisiológico.

Cambio V716M: El aminoácido Valina (V) es de naturaleza apolar, es sustituido por otro aminoácido apolar como es la Metionina (M), sin embargo este último presenta un átomo de azufre en su molécula que le puede permitir formar puentes disulfuro con otra Metionina.

Cambio I145M: El aminoácido Isoleucina (I) es apolar, tiene una cadena lateral, cambia por otro aminoácido apolar (M), con una cadena lateral de tamaño similar, pero conteniendo un atomo de azufre.

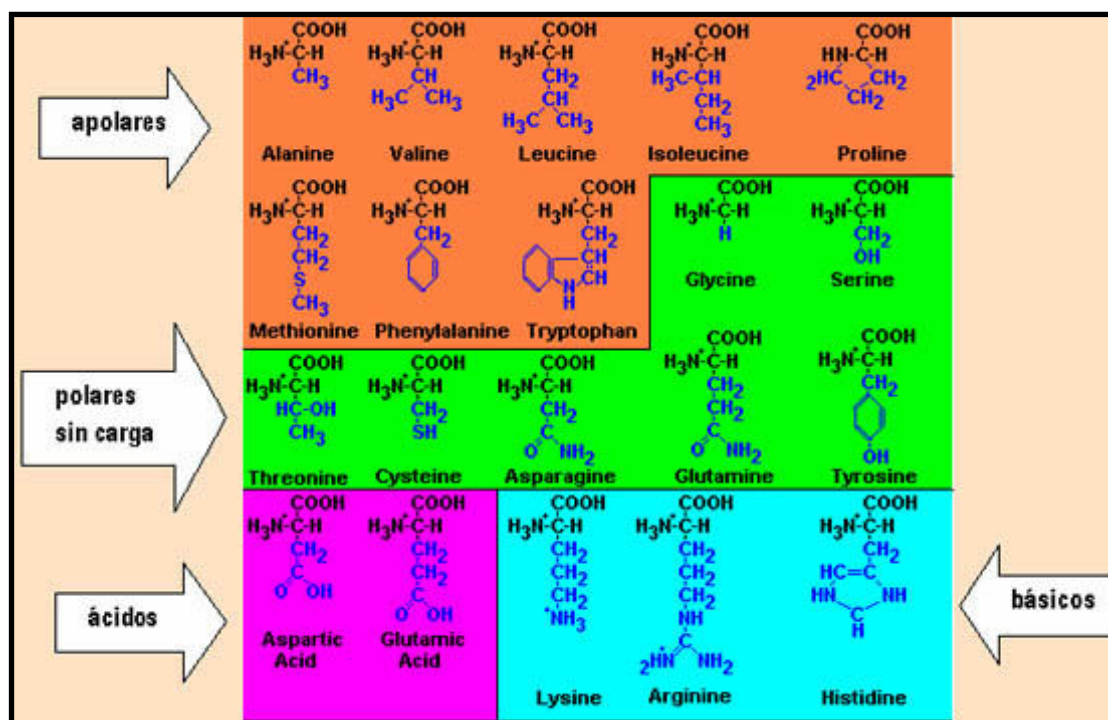


Figura 29: Resumen de algunas de las propiedades físico-químicas de los aminoácidos.

## 4.7 PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA

La predicción del efecto que producen los cambios aminoacídicos sobre la estructura secundaria es otra aproximación informática que nos puede permitir valorar el grado de patogenicidad de cualquier mutación detectada. Para ello se realiza una comparación entre la secuencia de aminoácidos nativa (normal), y la secuencia donde se ha sustituido el aminoácido normal por el mutante. El programa informático utilizado en este estudio se encuentra disponible para uso público en la dirección de Internet: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/dompred/DomPredform.html>.

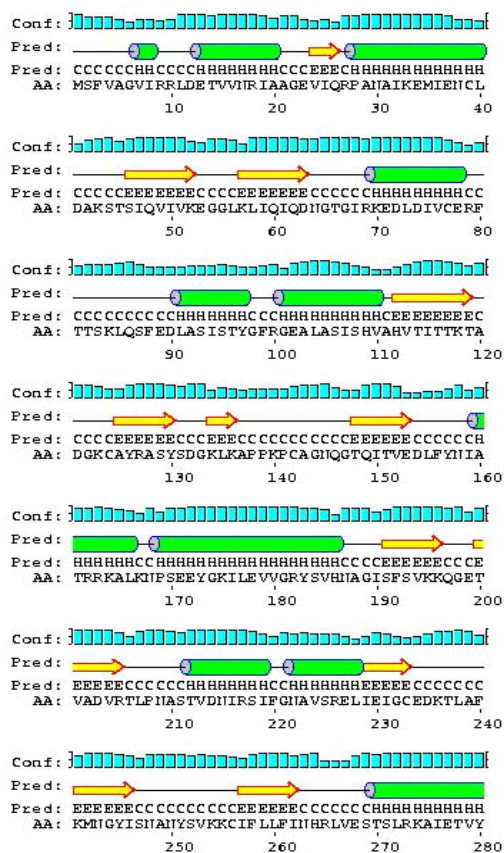
Gracias a esta predicción podemos determinar si el cambio de un aminoácido por otro supone una grave distorsión en la estructura secundaria de la proteína, y por lo tanto en su función. Estos cambios a veces aparecen en zonas alejadas de la posición donde ha ocurrido la mutación.

En las figuras siguientes se muestran las imágenes obtenidas con el programa de predicción, se representan como cilindros de color verde las regiones de  $\alpha$ -hélice, como flechas de color amarillo las regiones de  $\beta$ -lamina plegada, y como una línea las regiones que no adoptan ningún tipo de conformación secundaria. Con un círculo rojo se han rodeado en las proteínas portadoras de mutación las regiones que han cambiado su estructura secundaria. Debido a la longitud de la secuencia de aminoácidos el programa nos ofrece las predicciones fraccionadas en distintas páginas consecutivas numeradas como 1, 2, 3 y 4.

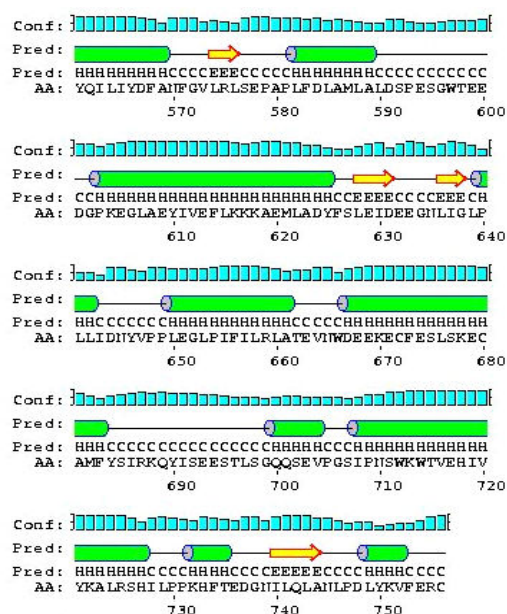
Las predicciones referentes a la proteína *hMLH1* corresponden a las **figuras 30** (nativa), **31** (mutación K618A) y **32** (mutación V716M). En ellas podemos apreciar que la mutación provoca varios cambios en la estructura secundaria, mientras que la mutación V716M curiosamente no ha provocado ninguno.

Las predicciones realizadas para la proteína *hMSH2* se muestran en las **figuras 33** (nativa), **34** (mutación I145M), **35** (mutación G322D) y **36** (mutación P349A). En todas ellas se observan variaciones en la estructura secundaria. Curiosamente en la que menos alteraciones aparecen es en la mutación P349A, que afecta al aminoácido prolina el cual tiene unas importantes implicaciones estructurales. Debido a que dicha mutación se sitúa en una región sin estructura secundaria su efecto en la modificación de ésta a resultado más leve. Sin embargo no podemos concluir que esta mutación no tenga importancia, puesto que la función de la proteína depende además de la estructura secundaria de la conformación tridimensional que adopta (estructura terciaria). La mutación P349A podría crear una distorsión en la estructura terciaria que afectase a la actividad de la proteína, aunque dicha distorsión no aparezca reflejada en la secundaria.

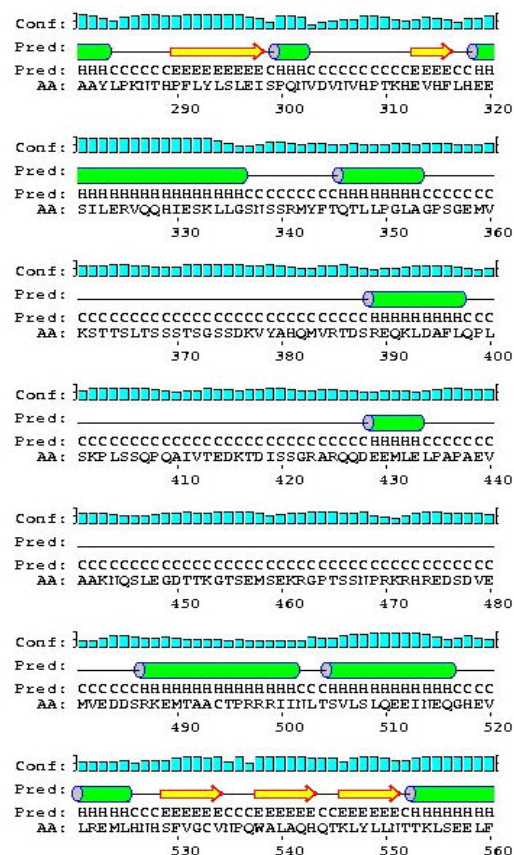
1



3



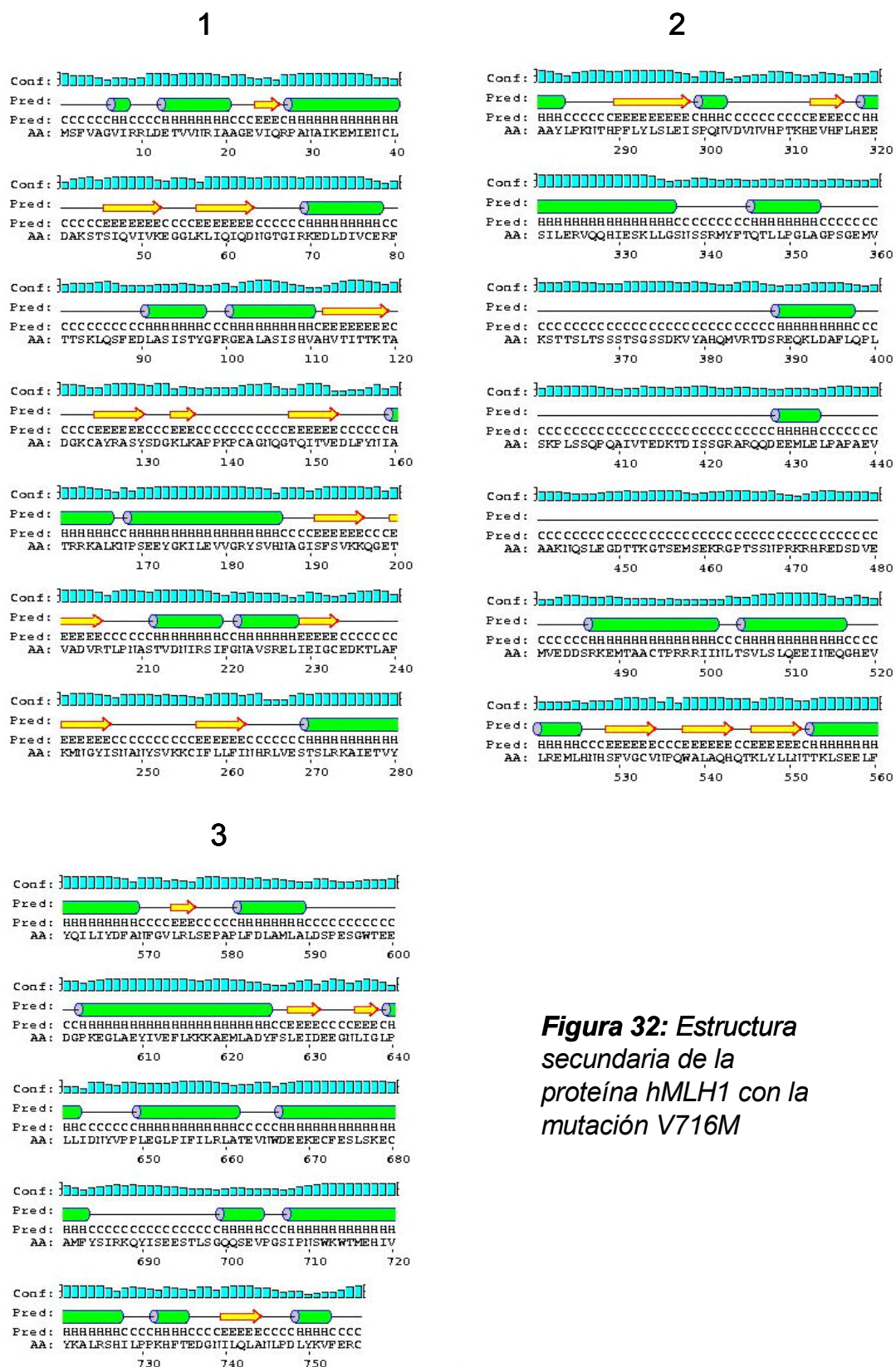
2



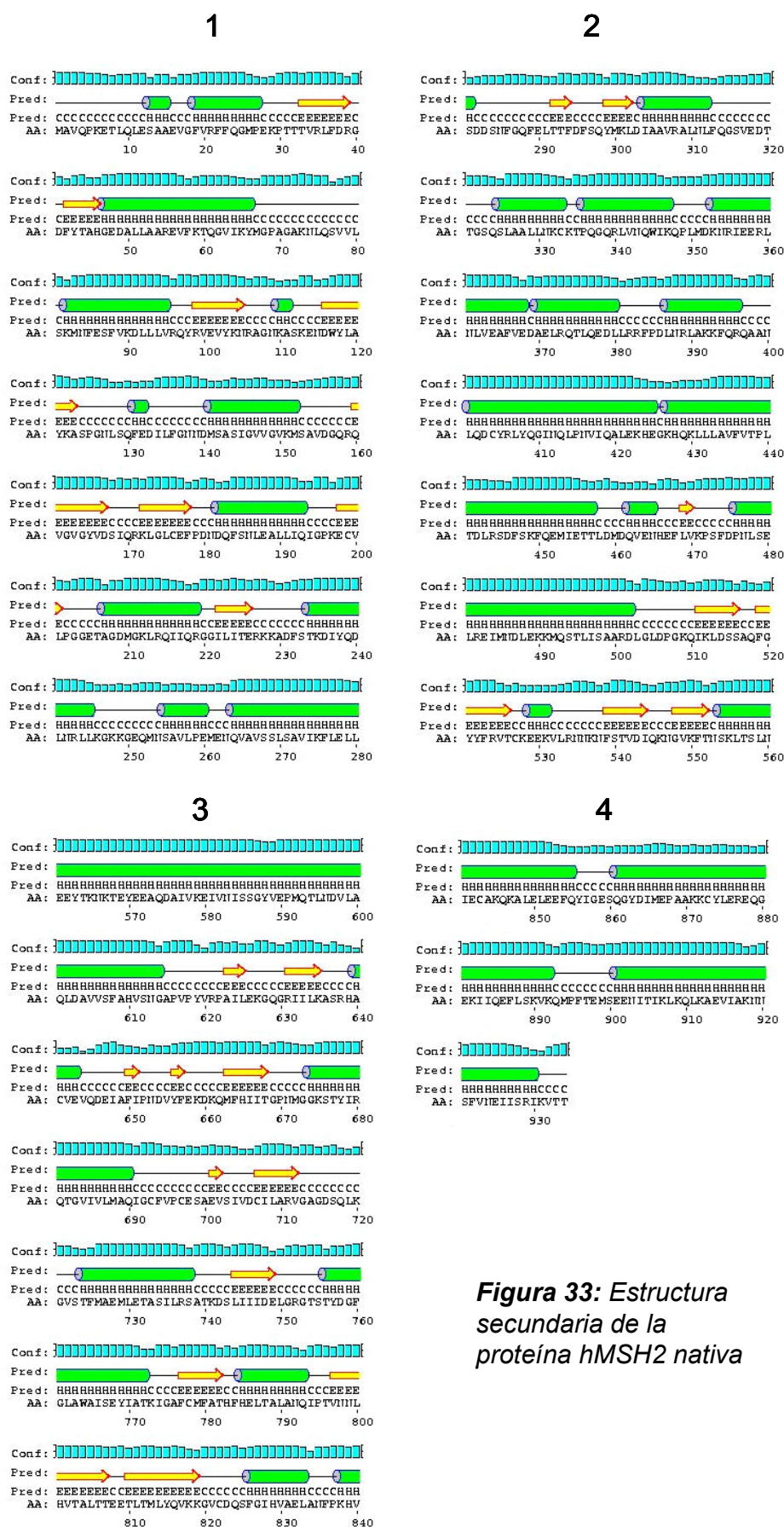
**Figura 30: Estructura secundaria de la proteína hMLH1 nativa**



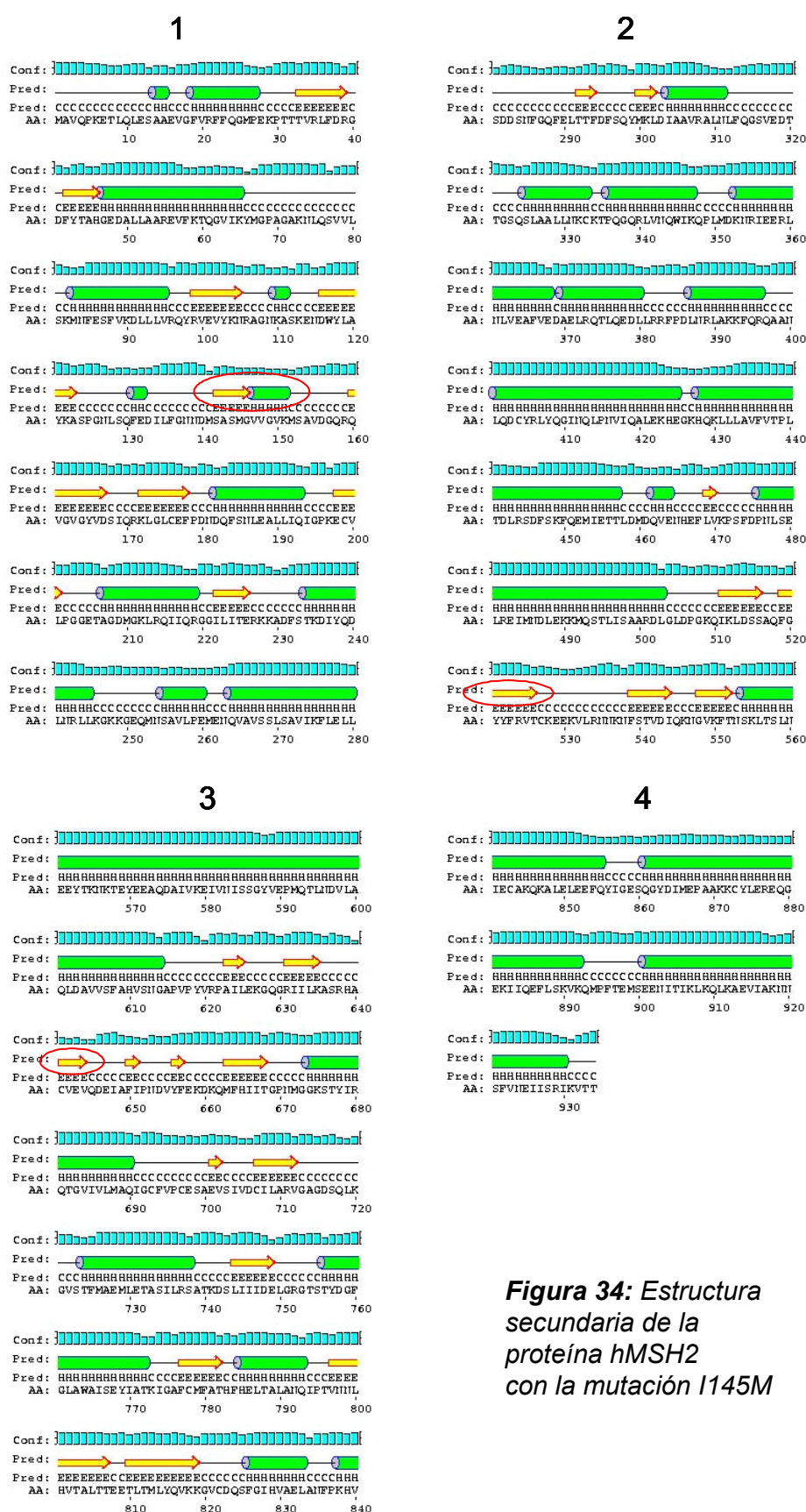




**Figura 32: Estructura secundaria de la proteína hMLH1 con la mutación V716M**

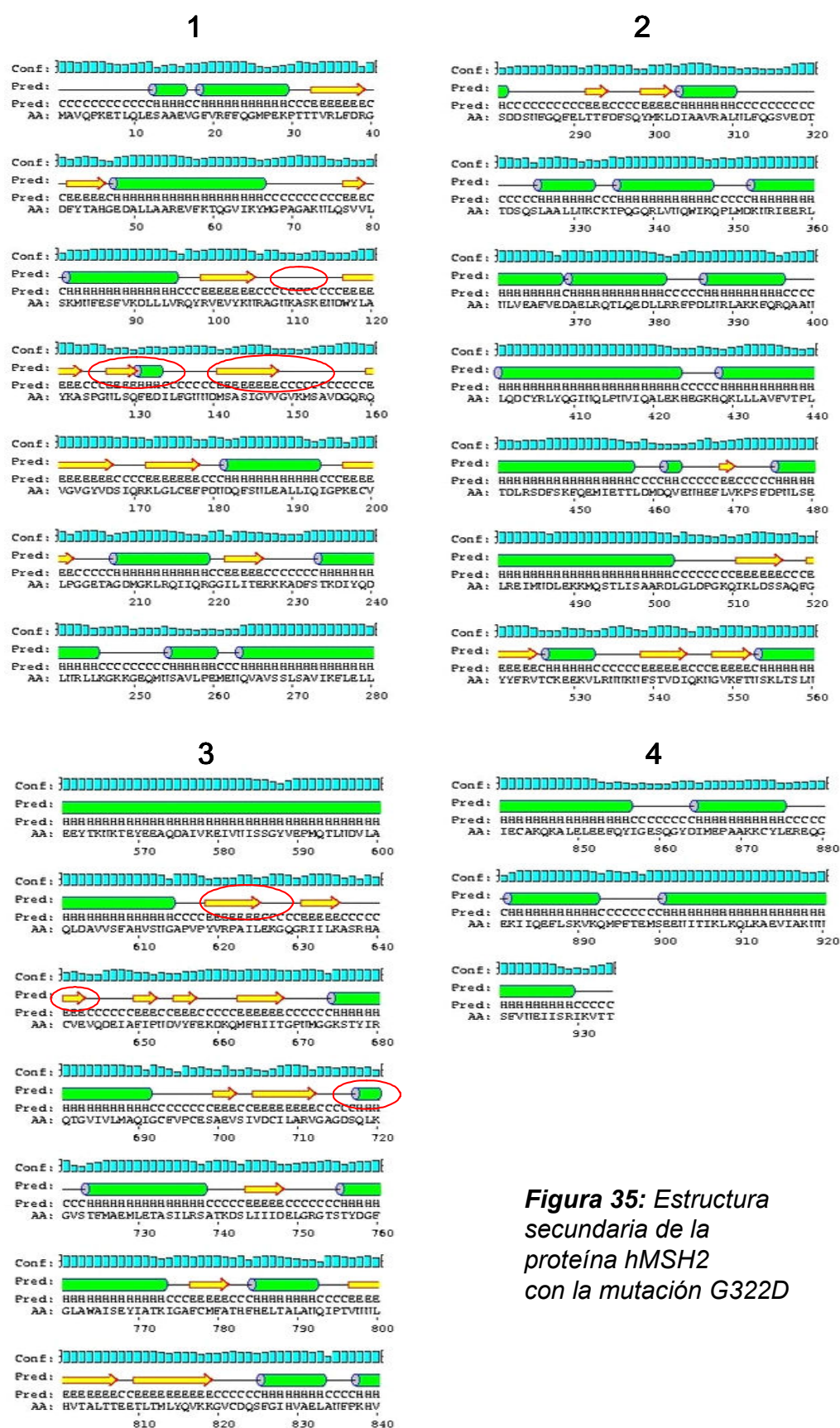


**Figura 33: Estructura secundaria de la proteína hMSH2 nativa**

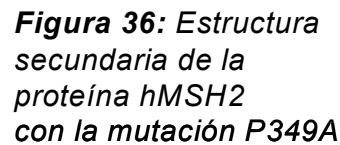


**Figura 34: Estructura secundaria de la proteína hMSH2 con la mutación I145M**





**Figura 35: Estructura secundaria de la proteína hMSH2 con la mutación G322D**



## **V. DISCUSIÓN**

## **5.1 COMENTARIOS AL MÉTODO**

### **5.1.1 Tipo de estudio.**

En este estudio se han seleccionado de manera consecutiva 89 pacientes diagnosticados de CCR esporádico del área de cobertura sanitaria del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (aproximadamente 375.000 habitantes). Este trabajo representa el primer estudio realizado sobre los genes MMR y cáncer renal en población española, y uno de los primeros con estas características, a nivel mundial.

Los datos en los que se basa este estudio proceden de dos fuentes fundamentales: en primer lugar las Historias Clínicas de los pacientes, las cuales se encuentran archivadas y organizadas en el Servicio de Archivos Generales del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete; y en segundo lugar, de muestras de tejido tumoral renal y de parénquima renal sano, de las que enviamos un fragmento al Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete para su análisis histopatológico y conservamos otro fragmento para su análisis molecular. Dicho análisis se realizó en la Unidad de Investigación de dicho Complejo Hospitalario, en la que realizamos la extracción de ADN, y la Facultad de Medicina de Albacete de la Universidad de Castilla-La Mancha (Laboratorio del Área de Genética) donde se realizaron las reacciones de PCR, secuenciación, estudio de microsatélites y análisis de hipermetilación.

La obtención de datos de la primera fuente no ocasionó problemas importantes. Al tratarse de un estudio transversal los cuestionarios de recogida de datos se completaron en el momento en el que se revisó al paciente tras su alta en consulta externa.

En cuanto a la obtención de las muestras de tejido, una vez extraída la pieza quirúrgica previo consentimiento informado, se obtuvo de la misma una porción de muestra tumoral suficiente para su tratamiento en el laboratorio. Para ello se procuró obtener tejido que macroscópicamente no presentara aspecto necrótico o hemorrágico y en cantidad suficiente. Asimismo, se obtuvo una pequeña porción de tejido macroscópicamente sano, que en el caso de las nefrectomías radicales se extrajo del parénquima renal más alejado del tumor, y en las nefrectomías parciales del margen de seguridad de parénquima sano, también lo más alejado posible del tumor. Las muestras una vez obtenidas fueron congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

En cuanto a los sujetos control analizados en este estudio, se obtuvo una muestra de sangre, tras solicitar su consentimiento informado, una vez que entraron a quirófano para tratarse de patologías quirúrgicas benignas.

El tipo de estudio que se ha planteado en este trabajo de tesis doctoral tiene las limitaciones comunes a cualquier estudio transversal en función de sus posibles sesgos de incidencia-prevalencia y de ambigüedad temporal.

### **5.1.2 Características de los pacientes de la muestra**

Los pacientes de nuestro estudio no difieren significativamente en cuanto a edad y sexo del resto de series publicadas sobre CCR<sup>114,116,186</sup>, confirmándose por tanto que es una patología más prevalente en hombres de 50 a 70 años de edad.

En los últimos años se ha producido un incremento en la incidencia del cáncer renal debido en parte al aumento del uso de técnicas de imagen. Gracias a esto hoy en día los tumores renales se diagnostican de manera más precoz, cuando todavía no han presentado ninguna sintomatología y siendo por tanto de menor tamaño, lo que les

confiere un mejor pronóstico<sup>186,187</sup>. Más de la mitad de los pacientes de este estudio (55%) fueron diagnosticados de manera incidental, lo que apoya la confirmación de esta tendencia.

En cuanto al tipo de tratamiento efectuado hay que destacar la tendencia creciente a realizar cirugías conservadoras electivas en estos enfermos<sup>152</sup>. Así, en el 24,7% de los casos se realizó nefrectomía parcial, con margen de parénquima renal sano. En estos casos, para tomar la decisión de realizar cirugía conservadora se tuvo en cuenta la localización tumoral, el tamaño tumoral, el estadio clínico y la preferencia del paciente. No obstante, la nefrectomía radical fue la opción quirúrgica mayoritaria.

El tamaño más frecuentemente encontrado en el momento del diagnóstico de los tumores renales oscila entre 5 y 8 cm., tal y como ocurrió en el presente estudio, ya que el 46,1% de los tumores fueron diagnosticados con un tamaño entre 4 y 7cm. En el presente estudio, el tamaño tumoral fue menor de 7 cm. en los casos que se diagnosticaron de manera incidental, por lo que, el diagnóstico precoz hace que los tumores detectados sean de menor tamaño y probablemente presenten mejor pronóstico<sup>187</sup>.

Una de las características del carcinoma renal es la presencia de nódulos satélites, que varía del 4,4 al 22,4% de los casos<sup>149</sup>. Este hecho plantea un problema a la hora de manejar los tumores renales, ya que es difícil el diagnóstico y si realizamos cirugía conservadora queda la posibilidad de dejar lesiones satélites. No obstante, el comportamiento de estas lesiones continúa siendo incierto y la tasa de recidiva baja<sup>149,152</sup>. En nuestra serie la tasa de tumores múltiples fue baja (únicamente dos casos).

El carcinoma de células claras es también llamado carcinoma renal convencional, puesto que es el subtipo histológico más frecuente rondando el 70% de todos los tumores de células renales. De éstos, aproximadamente el 5% sufren

diferenciación sarcomatoide, siendo además la variante que más comúnmente sufre esta diferenciación <sup>135</sup>. De los 89 casos que se estudiaron en este trabajo, 59 (66,3%) fueron carcinomas de células claras y otros 5 (5,6%) presentaron diferenciación sarcomatoide. Aunque no en todos estos casos fue posible conocer la estirpe celular de origen, en la mayoría se pudieron reconocer células compatibles con la estirpe celular convencional. Este tipo de tumor es el de peor pronóstico de todas las variantes celulares, aunque dicho pronóstico mejora con el diagnóstico precoz <sup>139</sup>.

El segundo tipo de tumor en frecuencia es el carcinoma papilar, cuya frecuencia oscila entre el 10 y 15% <sup>135</sup> (12,4% en este trabajo) siendo su pronóstico más favorable que el de células claras y menor que el tercer tipo en frecuencia, el carcinoma cromóforo <sup>139</sup>.

En definitiva, en este estudio se ha encontrado una distribución de subtipos anatomopatológicos similar a la de la literatura, si bien, la variante cromófoba ha sido ligeramente superior a la descrita clásicamente, aunque en los últimos años se ha producido un incremento en el diagnóstico de esta variante <sup>139</sup>, lo que apoya los hallazgos de este estudio.

Aunque el grado nuclear presenta ciertas controversias a la hora de su utilización, constituye el factor pronóstico más importante después del tipo histológico y del estadio tumoral <sup>188</sup>. El grado nuclear más frecuentemente hallado en los carcinomas de células claras es el grado 2, estando en debate la necesidad de cambiar el sistema de graduación, unificando los grados 1 y 2 <sup>142,189</sup>, ya que parece ser que la influencia pronóstica del grado nuclear es más significativa cuando se agrupan los tumores bien diferenciados (G1 y G2 de Fuhrman) y los tumores indiferenciados (G3 y G4 de Fuhrman) <sup>147</sup>.

En el presente estudio se detectó una relación estadísticamente significativa entre el grado nuclear y el tamaño tumoral, con una tendencia lineal creciente, de modo que a mayor tamaño tumoral se halló mayor grado nuclear. Ambas variables suponen un factor pronóstico, por lo que a la vista de estos datos, observamos que en la evolución de un tumor renal, su crecimiento en cuanto a tamaño va acompañado de desdiferenciación nuclear. También se halló relación con el motivo de consulta, lo que apoya lo comentado anteriormente, puesto que los tumores con menor grado nuclear fueron siempre diagnosticados de manera incidental, mientras que ningún tumor grado 4 se diagnosticó de esta manera.

Todos estos datos sirven de cierto control a la hora de realizar un tratamiento, de manera que los tumores con menor grado nuclear, con menor tamaño y habitualmente asintomáticos, deberían ser los susceptibles de ser tratados con técnicas más conservadoras, como así ocurrió.

Dentro de todos los posibles factores pronósticos del cáncer renal, la extensión tumoral constituye el más importante de estos factores. Para ello, en el cáncer renal las clasificaciones más utilizadas son dos: la de Robson y la TNM. Siguiendo la clasificación TNM <sup>143</sup>, se obtuvo una mayoría de estadios pT bajos, por debajo de pT2, lo que concuerda con los resultados obtenidos de mayor número de tumores asintomáticos.

Existe una controversia en la clasificación del estadio pT, ya que los dos primeros, pT1 y pT2, se basan exclusivamente en el tamaño del tumor, y algunos autores consideran que ciertos tumores encuadrados en estadios muy bajos, no pueden ser tratados de manera conservadora, pues tienen tasas de recidiva y progresión altas <sup>146</sup>. No obstante, parece que el corte de 4 cm es el más relevante, pues no se han visto



diferencias en términos de supervivencia entre los tumores con tamaño entre 4 y 7 cm., y aquellos de más de 7 cm.<sup>190</sup>. En cualquier caso, la mayoría de los casos con estadio pT bajo en este estudio fueron asintomáticos y tratados con cirugía conservadora, mientras que ningún estadio pT4 resultó asintomático, y ningún tumor pT3 o pT4 fue tratado con técnicas ahorradoras de parénquima renal. De igual forma y siguiendo los datos expuestos anteriormente, el grado nuclear fue mayor en los tumores con estadios pT más avanzados.

En cuanto al estadio pN, sólo fue evaluado en 24 casos, ya que la linfadenectomía no se realizó en todos los casos. El papel de la linfadenectomía en el cáncer renal sigue siendo un tema de discusión hoy en día, ya que no se ha demostrado que mejore la supervivencia. Tampoco hay acuerdo sobre cuál debe ser su extensión.

La presencia de metástasis a distancia implica muy mal pronóstico. No obstante, dado que el cáncer renal presenta una historia natural poco predecible, en ciertos casos, se puede encontrar pacientes con tumores metastatizados con supervivencias largas<sup>118</sup>. En este estudio, los pacientes que presentaron metástasis al diagnóstico tuvieron tumores que se manifestaron clínicamente en todos los casos excepto en dos, y que la mayoría de los casos presentaron grados nucleares 3 ó 4. El 66,7% de los pacientes con metástasis presentaron tumores en estadio superior a T3.

### **5.1.3 Estudio genético de las muestras.**

El análisis molecular de este trabajo se llevó a cabo sobre muestras de ADN genómico extraído a partir de tumor renal en fresco y de parénquima renal sano. Este hecho obligó a un manejo cuidadoso de las muestras, sobre todo de aquéllas de las que sólo se pudo obtener pequeñas cantidades, ya que la inadecuada manipulación de las

mismas podría llevar a la desestructuración o incluso a la pérdida de un material procedente de un tipo de tumor de relativa escasa incidencia. Además, el tumor renal presenta una gran heterogeneidad en su estructura, lo que en ocasiones dio lugar a dificultades en el tratamiento de las muestras. Como control al tejido tumoral se utilizó tejido renal sano en vez de sangre. La utilización de un tejido sólido presenta mayores dificultades tanto de obtención de la muestra como de procesado y purificación del ADN, sin embargo al tratarse del mismo tejido y con un origen común, disminuimos la posibilidad de confundir mutaciones que hayan podido surgir espontáneamente en el linaje celular que originó el riñón, con aquellas mutaciones exclusivas del tumor.

#### **5.1.3.1 Extracción de ADN**

Esta tarea laboriosa supone el inicio del trabajo en el laboratorio. Se comienza seleccionando un fragmento de la muestra de un tamaño apropiado (unos 30 miligramos) para obtener la suficiente cantidad de ADN, pero sin ser excesivo, pues se pueden saturar las columnas utilizadas para ello, dando como resultado bajos rendimientos.

Una vez obtenido el ADN, se valora su calidad en geles de agarosa, pues es común que en tejidos muy hemorrágicos o necróticos (como es frecuente en el caso del CCR) así como en muestras mal conservadas, el ADN se encuentre muy degradado, hecho que dificulta e incluso llega a imposibilitar su estudio. Posteriormente el ADN se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm mediante un espectofotómetro, y se congeló a -80°C hasta su utilización.

### **5.1.3.2 Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa**

Esta técnica constituye el eje principal del actual trabajo. Fue necesario realizarla en los tres estudios genéticos: detección de mutaciones, análisis de microsatélites y estudio de hipermetilación. Para realizar el estudio de mutaciones se amplificaron los 19 exones de *hMLH1* y los 16 de *hMSH2*. Para el análisis de microsatélites se amplificaron 8 fragmentos y para el estudio de hipermetilación 3. Esto supuso un total de 54 reacciones de PCR por paciente, y si lo multiplicamos por los 89 pacientes incluidos en el estudio nos da un resultado de cerca de 5000 reacciones de PCR, a las que hay que añadir los numerosos casos en que fue necesario repetirlas. Todo ello da una idea de la laboriosidad del estudio que se presenta.

Excepto en el caso del estudio de hipermetilación, los cebadores fueron diseñados explícitamente para este trabajo y fue necesario poner a punto las condiciones de amplificación en todos los casos, un total de 43 parejas de cebadores.

Además del manejo de tal cantidad de muestras, el principal problema de esta metodología fue conseguir una buena amplificación que permitiese su posterior estudio. En muchos casos hubo que hacer numerosas repeticiones debido a la mala calidad del ADN de partida, y en algunos, tras intentar nuevas extracciones de ADN, hubo que retirarlos del estudio por no conseguir una calidad del material genético adecuada. Por otra parte, el principal problema de la PCR suele ser la contaminación de los amplificadores por ADN distinto al que se pretende estudiar, que puede ser de otro paciente o incluso del propio investigador por no tomar las necesarias precauciones a la hora del manejo de las muestras. En este sentido se tomaron todas las precauciones necesarias como la utilización de material esterilizado, de puntas con filtro y guantes por parte del investigador, lo que permitió descartar problemas de contaminación.

### **5.1.3.3 Reacción de secuenciación**

Esta técnica constituye la forma más eficaz de detección de mutaciones, superando a otras técnicas como DGGE, TTGE o TGGE. Sin embargo, tiene el inconveniente de ser más cara, trabajosa y precisar de aparatos más sofisticados. La puesta a punto fue realizada por el Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Castilla-La Mancha, donde sus responsables son expertos en esta metodología.

Para realizar esta técnica se necesita un producto de PCR de partida, que debe ser purificado previamente a realizar la reacción de secuenciación con el fin de eliminar los cebadores y nucleótidos no consumidos durante la misma. Esta reacción posteriormente también debe ser purificada antes de ser analizada en el secuenciador, para eliminar parte de los fragmentos de menor tamaño y homogeneizar la señal de fluorescencia. En total se realizaron más de 3000 reacciones de secuenciación, con sus respectivas purificaciones. Tras la electroforesis capilar en el secuenciador automático, todas las secuencias se revisaron visualmente. Teniendo en cuenta que los genes *hMLH1* y *hMSH2* tienen 756 y 934 aminoácidos respectivamente, si los multiplicamos por 3 (puesto que cada aminoácido está codificado por 3 bases) obtenemos el número de bases pertenecientes a regiones exónicas que fue necesario leer. Este número es de 5050 bases exónicas por paciente, y más de 450.000 en todo el estudio.

En cuanto a los problemas que pueden surgir son varios, muchos de ellos derivados de un producto de PCR de mala calidad, bien por su baja concentración, o por una inadecuada purificación de la misma. También dificulta el estudio el hecho de que los fragmentos exónicos que se deben estudiar sean de un tamaño excesivo. En

nuestro caso no hubo ningún tipo de problemas y las secuencias fueron por lo general de una buena calidad, lo cual garantiza la fiabilidad del análisis.

Cuando se detectó una anomalía en una secuencia analizada no se consideró mutación hasta que no se confirmó mediante secuenciación de la cadena complementaria. Con esta rutina se pretendió eliminar al máximo los posibles errores en la lectura de las secuencias, así como estar seguros completamente de que los cambios nucleotídicos encontrados eran reales.

Cuando se confirmó una mutación en ADN tumoral, se llevó a cabo la secuenciación en ADN de tejido sano procedente del mismo paciente. Este control nos permitió conocer si las mutaciones eran somáticas o constitutivas.

Finalmente, en los pacientes del grupo control y a partir de ADN extraído de muestras de sangre, se secuenciaron también los exones correspondientes a los genes estudiados donde aparecieron mutaciones (exón 16 del gen *hMLH1* y exón 6 del gen *hMSH2*), con la finalidad de determinar si correspondían a verdaderas mutaciones patogénicas, o por el contrario eran variantes polimórficas.

#### **5.1.3.4 Análisis de microsatélites**

Se realizó sobre los marcadores microsatélites del panel de Bethesda <sup>112</sup>, recomendados para el estudio de inestabilidad genética causada por defectos en los genes MMR. Además se incorporaron al estudio los microsatélites exónicos de los genes *TGFβrII* y *BAX*, los cuales aparecen mutados en la mayoría de tumores colorrectales que cursan con inestabilidad en microsatélites.<sup>52,54</sup> Por último se estudió también el microsatélite D3S1611, que se localiza próximo al gen *hMLH1* seleccionado con el fin detectar LOH en esta región.

El presente estudio supuso la introducción de la técnica de análisis de microsatélites en nuestro laboratorio. Por esta razón nos enfrentamos al reto de su puesta a punto. Para ello se realizó una estancia en la Unidad de Genética del Hospital “La Fe” de Valencia donde realizan este tipo de estudios de forma rutinaria y gracias a los consejos de su personal conseguimos poner en marcha este análisis.

Fue necesario diseñar diferentes parejas de cebadores, y a uno de cada pareja se le incorporó un fluoróforo en su extremo 5'. La elección se realizó en base al tamaño del amplicón, pues se dispone de cuatro fluoróforos y deseábamos analizar ocho microsatélites, lo que obligó a marcar varios microsatélites con el mismo fluoróforo. La elección se realizó de forma que los microsatélites que se marcaban con un mismo fluoróforo fueran lo bastante distintos respecto al tamaño del amplicón para no solapar las señales. Una vez diseñados se pusieron a punto las condiciones de amplificación y se realizaron las correspondientes reacciones de PCR. Posteriormente hubo que poner a punto las condiciones de electroforesis. Debido a la alta intensidad de la señal, las reacciones de PCR fueron diluidas en la mayoría de los casos antes de someterlas a electroforesis capilar. El análisis y visualización de los resultados se llevó a cabo con el programa informático “Genescan” de Applied Biosystems<sup>®</sup>, para lo que fue necesario la familiarización con dicho programa para poder interpretar los resultados. Todos estos pasos se consiguieron solucionar sin especiales dificultades.

### 5.1.3.5 Estudio de hipermetilación del promotor del gen *hMLH1*

Para estudiar el estado de hipermetilación de las regiones promotoras de los genes actualmente se dispone de varias técnicas. Algunas de ellas están basadas en la modificación química de ADN genómico mediante su reacción con bisulfito sódico. Esta reacción transforma las citosinas no metiladas en uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen como tales <sup>191</sup>, propiedad que permite diferenciar el ADN metilado del que no lo está. Las principales técnicas que se basan en esta reacción son:

- MSP (*methylation specific PCR*): Consiste en realizar una reacción de PCR utilizando dos juegos de cebadores, unos que hibriden con la secuencia del ADN sin modificar y otros con la secuencia del ADN modificado mediante la conversión de citosinas en uracilos. Dependiendo de con que pareja de cebadores obtengamos el producto de amplificación podremos deducir cual es el estado de metilación de la secuencia que estamos estudiando. Para poder realizarlo los cebadores deben hibridar en zonas donde haya islas CpG.
- BSP (*Bisulfite sequencing PCR*): Posteriormente a la modificación del ADN genómico con bisulfito sódico, se realiza una amplificación con cebadores específicos para la secuencia modificada, y una posterior secuenciación del producto de amplificación. La reacción con bisulfito sódico transforma las citosinas no metiladas en uracilos, que al amplificarse por PCR serán complementarios de timina. Por tanto al secuenciar sólo observaremos citosinas en la secuencia cuando estas se encontraban metiladas en la secuencia. Esta técnica permite estudiar fragmentos de ADN mayores que cualquier otra. A la hora de diseñar los cebadores hay que evitar aquellas regiones donde haya islas

CpG, de forma que tengamos la seguridad de que todas las citosinas se modificarán, y por tanto que los cebadores diseñados contra la secuencia modificada hibridarán correctamente.

En nuestro estudio hemos evitado la utilización de estas técnicas por la dificultad que conlleva la modificación química del ADN. Concretamente es común la degradación del ADN debido al agresivo tratamiento químico, así como la dificultad de conseguir una buena purificación y eliminación de las sales utilizadas. El elevado número de muestras de ADN y la escasez de las mismas hizo necesario la elección de una técnica más sencilla, rápida y reproducible. Por esta razón hemos utilizado una técnica basada en la capacidad que tienen determinadas enzimas de restricción, como *HpaII* y *MspI*, de distinguir el estado de metilación de su diana de restricción.

Esta técnica ha sido validada por otros estudios <sup>182</sup> y nos ha permitido estudiar tres regiones que poseen islas CpG en su interior, lo cual nos da una seguridad mayor que si sólo estudiáramos una sola isla CpG como hacen algunos estudios de MSP <sup>192</sup>. El único problema que planteó la técnica es la existencia de digestiones incompletas, con la consiguiente posibilidad de obtener falsos positivos. Este problema se solucionó disminuyendo el número de ciclos de amplificación de forma que obtuviéramos amplificación en los controles positivos, y antes de que apareciese amplificación en los controles negativos. Además, el uso de un programa informático de cuantificación de los productos de amplificación mediante análisis densitométrico, nos permitió controlar esta dificultad y descartar que los amplificados obtenidos fueran debidos a fenómenos de hemimetilación.



## 5.2 COMENTARIOS AL RESULTADO DE LA BÚSQUEDA DE MUTACIONES

El estudio de secuenciación ha revelado la escasa incidencia de mutaciones en los genes MMR en muestras de cáncer renal esporádico en la población analizada. Sólo se han detectado mutaciones en ocho pacientes. Tres enfermos presentaron mutaciones en *hMLH1* (3,7%) y cinco en *hMSH2* (5,61%), todas las mutaciones fueron puntuales, implicaron cambios en la secuencia de la proteína, aparecieron en heterozigosis y a nivel constitutivo. El tipo celular en el que se detectaron fue CCR de células claras en todos los casos. Estas mutaciones fueron: dos pacientes con un cambio K618A, y uno con el cambio V716M en el gen *hMLH1*. En el gen *hMSH2*, cuatro pacientes mostraron el cambio G322D, uno el cambio I145M y otro el cambio P349A.

A la hora de valorar el grado de patogenicidad de estas mutaciones, la primera aproximación fue hacer búsquedas bibliográficas donde se describieran las mismas. Las mutaciones K618A y V716M del gen *hMLH1*, y G322D del gen *hMSH2*, han sido descritas en familias con HNPCC <sup>193</sup>. Sin embargo su valor patogénico en estudios previos es controvertido. Análisis funcionales sobre líneas celulares muestran que la función reparadora no está disminuida en las mutaciones K618A y V716M<sup>194</sup>, mientras que en otros estudios estas mutaciones se asocian con la presencia de MSI en humanos <sup>195</sup>. Hay estudios donde se concluye que el cambio K618A es una variante polimórfica sin relación con la enfermedad <sup>196</sup>, mientras que en otro se afirma que dicha variación afecta a la estabilidad de la proteína disminuyéndola. La mutación G322D del gen *hMSH2* ha sido descrita como patogénica <sup>197</sup>, y también como variante polimórfica <sup>198</sup>. La mutación I145M, en este mismo gen, ha sido previamente asociada a fenotipo MSI, aunque los portadores no cumplían los criterios de Amsterdam o Bethesda <sup>199</sup>.

Finalmente y para complicar más si cabe este rompecabezas, un estudio publicado este mismo año incluso sugiere un valor protector de algunas de las variantes descritas en este trabajo, concretamente el cambio V716M del gen *hMLH1* y el G322D de *hMSH2*

200

Puesto que las mutaciones K618A y G322D fueron detectadas en dos y cuatro de los pacientes respectivamente incluidos en el estudio, estos resultados podrían apoyar la hipótesis de que estos cambios sean realmente variantes polimórficas. Para tratar de dilucidar esta cuestión, se secuenciaron 95 sujetos sanos de nuestra población, detectándose el cambio K618A del gen *hMLH1* en tres individuos (3,16%) y el cambio G322D de *hMSH2* se en dos (1,9%). Este hallazgo apoya la teoría de que dichos cambios podrían encontrarse en porcentaje de polimorfismos, y tal vez constituyan variantes de reducida patogenicidad.

En este estudio se describe por primera vez la mutación P349A en el gen *hMSH2*. Esta mutación podría causar cambios severos en la cadena polipeptídica, ya que el aminoácido prolina normalmente provoca un giro en la cadena polipeptídica y podríamos decir con alta probabilidad, que se trata de una mutación que afecta de manera importante a la estructura y a la función de la proteína. Otra mutación descrita por primera vez es la K618R del gen *hMLH1*, encontrada en un individuo control y representa el segundo cambio descrito en este trabajo afectando al aminoácido 618 del gen *hMLH1*

El aminoácido Lisina (K) tiene propiedades básicas al igual que el aminoácido Arginina (R) por el cual es sustituido, presentando carga positiva a pH fisiológico, y un tamaño similar. Este cambio podría considerarse suave, no está descrito previamente, pero al haberse detectado solamente en controles y no en enfermos no podemos concluir nada respecto a su posible patogenicidad.

Un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de valorar el grado de patogenicidad de las mutaciones encontradas, es la historia personal y familiar de los pacientes. Puesto que las mutaciones detectadas son constitutivas, y teniendo en cuenta que la penetrancia del HNPCC descrita para portadores de mutaciones patogénicas heredadas en los genes MMR es del 90% <sup>105</sup>, es previsible que la mayoría desarrollaría HNPCC a lo largo de su vida. Sin embargo ninguno de los portadores de mutación padeció HNPCC, pese a superar todos ellos la edad media de aparición de este tipo tumoral en afectados de este Síndrome. Tampoco hubo antecedentes familiares de HNPCC, sugiriendo estos datos que las variaciones K618A y G322D detectadas en seis de los casos podrían ser de escasa patogenicidad. Sin embargo con los datos del estudio no podemos concluir si constituyen o no un factor de riesgo que predisponga sufrir CCR.

En definitiva en este trabajo hemos descartado que los genes MMR jueguen un papel importante en la génesis del cáncer renal esporádico, además hemos clasificado la mayor parte de las mutaciones encontradas como polimorfismos gracias al estudio de controles sanos. Muchos estudios no toman la precaución de estudiar muestras controles, y consideran como patogénicas todas las mutaciones que detectan en los pacientes, esto puede estar provocando una sobreestimación del número de mutaciones reales y, en consecuencia, se pueden estar atribuyendo a estos genes la responsabilidad de originar más casos de Síndrome de Lynch de los que realmente causan.

En cuanto a los polimorfismos encontrados, el único que se traduce en un cambio de aminoácido es el I219V encontrado en el exón 8 del gen *hMLH1*, y aunque se ha descrito que no provoca un cambio en la funcionalidad de la proteína en cuanto a su capacidad reparadora <sup>194</sup>, hay estudios donde encuentran relación entre el genotipo

GG y el desarrollo de colitis ulcerosa <sup>201</sup>. Sin embargo en nuestro estudio no hemos encontrado relación con ninguna de las variables del estudio.

### 5.3 COMENTARIOS AL RESULTADO DEL ESTUDIO DE HIPERMETILACIÓN

La primera vez que se descubrió metilación de las islas CpG en un gen supresor de tumor fue en el gen retinoblastoma en 1989 <sup>202</sup>. Sin embargo, no fue hasta 1994 cuando surgió la hipótesis de que la hipermetilación de estas islas CpG situadas en el promotor podría ser una forma de inactivar genes. Estos hallazgos se realizaron en el gen *VHL* <sup>203</sup>. Desde esa fecha el número de genes con hipermetilación asociada a tumores ha aumentado considerablemente <sup>204</sup>.

Inicialmente se pensó que la alteración principal en el patrón de metilación en cáncer se correspondía con una hipometilación global <sup>205</sup>, que causaría la expresión masiva de aquellos oncogenes que normalmente estuvieran hipermetilados <sup>206</sup>. Hoy en día esta hipótesis se considera incompleta, de hecho la mayoría de islas CpG se encuentran desmetiladas en tejidos normales <sup>207</sup>. Sin embargo estos primeros estudios mostraron la existencia de regiones con hipermetilación en tumores que no aparecían hipermetiladas en su pareja de tejido normal. A estas áreas se les denominaron “*hot-spots*” adoptando la terminología aplicada a las mutaciones. Posteriores estudios de genes supresores como *RB1*, *VHL*, *p16<sup>INK4a</sup>*, *hMLH1* y *BRCA1* mostraron que la hipermetilación de sus promotores se asociaba a un silenciamiento transcripcional <sup>208</sup>.

Probablemente el proceso de adquisición de metilación es algo progresivo, al contrario de lo que ocurre con una mutación puntual que aparece de repente. En la región promotora existen muchas islas CpG, las cuales se van metilando poco a poco

hasta que cuando se encuentran metiladas con una alta densidad impiden la unión de factores transcripcionales y por tanto la expresión del gen<sup>204</sup>.

La cuestión de por qué sólo ciertas islas CpG se hipermetilan continúa siendo un misterio, se ha evidenciado una mayor actividad metiltransferasa en tumores que en tejido normal <sup>208</sup>, sin embargo este fenómeno se corresponde con estado global de hipometilación. Otro tema es el por qué ciertas islas CpG aparecen metiladas en tumores mientras que otras no lo están. Se ha postulado que estas alteraciones podrían proporcionar una ventaja selectiva a las células y que unas proteínas denominadas Polycomb podrían ser las encargadas de marcar las islas CpG metilables <sup>209,210</sup>.

Se ha evidenciado la presencia de perfiles específicos en los patrones de hipermetilación de genes supresores dependiendo del tipo de tumor <sup>211</sup>. Este patrón de inactivación epigenética no sólo ocurre en tumores esporádicos, sino que en ciertos tumores hereditarios se ha visto un patrón de metilación específico de ese tipo tumoral, pudiendo además actuar como un segundo impacto de inactivación <sup>212</sup>. Otro paralelismo entre las alteraciones epigenéticas y genéticas es la necesidad de acumular un cierto número ellas para que el tumor se establezca y progrese. Este perfil de hipermetilación específico de tumor se ha visto mantenido incluso en líneas celulares establecidas durante largos periodos <sup>213,214</sup>. También se ha observado que algunos tipos tumorales presentan un mayor grado de metilación en las islas CpG que otros, por ejemplo los tumores del tracto gastrointestinal presentan los niveles de hipermetilación más altos detectados, mientras que otros como los sarcomas presentan los más bajos <sup>178</sup>. En la **Figura 37** podemos ver la distribución de hipermetilación en tumores humanos, así como los porcentajes de los principales genes hipermetilados.

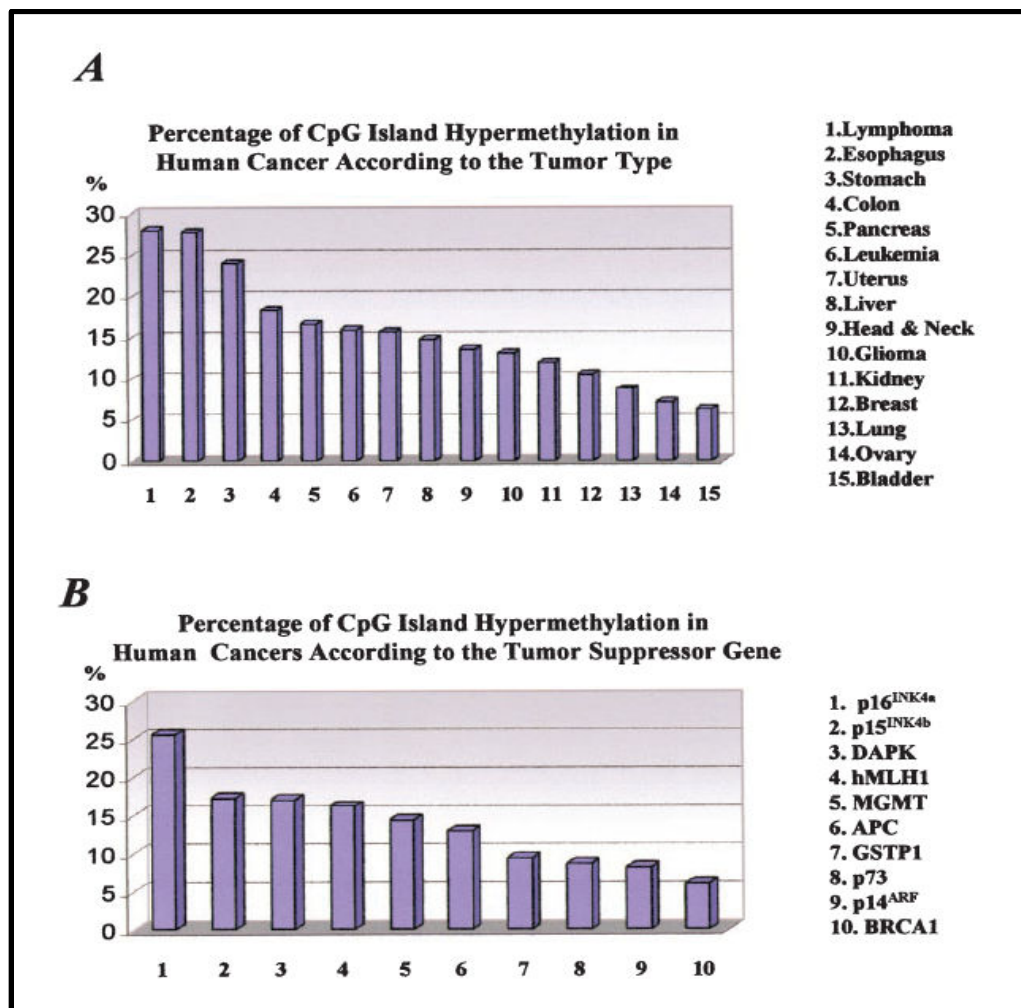


Figura 37: Distribución de hipermetilación en tumores humanos (adaptada de Esteller2002) <sup>204</sup>.

Estudios previos han mostrado que el CCR puede estar relacionado con la hipermetilación de una amplia variedad de genes, como por ejemplo *CDHI*, *APC*, *MGMT*, *RASSF1A*, *GSTP1*, *p16*, *RAR-beta2*, *ARF* *Timp-3*, *VHL* y el gen de la E-caderina<sup>215,216</sup>. Estos trabajos han evidenciado la presencia de hipermetilación en uno o más de estos genes en un 93% de los casos, siendo el gen hipermetilado más frecuentemente el *Timp-3* (58%). Incluso se ha comprobado que el tratamiento de algunas líneas celulares con 5-aza-2'-deoxicitidina (agente desmetilante) restauró la expresión del ARNm del gen E-caderina <sup>217</sup> y del gen *hMLH1* <sup>109</sup>. Por el contrario, otros estudios no han evidenciado diferencias en la expresión de *hMLH1* y *hMSH3* en

líneas celulares de CCR tratadas con este agente <sup>175</sup>. En cuanto al gen *VHL*, la hipermetilación de su promotor únicamente se ha descrito en el CCR de tipo células claras <sup>216</sup>.

Hasta donde sabemos, el presente estudio analiza por primera vez la relación entre la hipermetilación del promotor del gen *hMLH1* y el CCR esporádico empleando muestras de tejido tumoral humano. El estudio se centró en el gen *hMLH1*, ya que no se ha detectado hipermetilación en el promotor del gen *hMSH2* en estudios previos <sup>109</sup>.

Con una técnica basada en el uso de enzimas de restricción no hemos detectado metilación en el gen *hMLH1* en ninguna de las 89 muestras analizadas, coincidiendo con datos publicados en estudios previos con líneas celulares de CCR <sup>218</sup>. Aunque existen diferentes técnicas de análisis del estado de metilación (basadas por ejemplo en la modificación del ADN mediante tratamiento con bisulfito), éstas requieren mayor cantidad de ADN y presentan mayor complejidad metodológica que la empleada en el presente estudio. Además, la técnica basada en digestiones enzimáticas es rápida, sencilla y fiable <sup>219</sup>.

La presencia de un producto de amplificación minoritario en algunos de los ADN digeridos con *HpaII* se atribuyó a una digestión incompleta del ADN por parte de dicha enzima. Gracias al análisis densitométrico de las bandas, y a su comparación con las bandas tanto de los controles negativos como del positivo se descartó la hipótesis de hemimetilación.

En conclusión, nuestros resultados indican que la metilación del promotor del gen *hMLH1* no está implicada en la patogénesis del CCR esporádico.

## **5.4 COMENTARIOS A LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES**

Con el fin de identificar los cánceres de “fenotipo mutador” causados por defectos en los genes MMR, se han diseñado técnicas basadas en la PCR encaminadas a detectar inestabilidad de microsatélites, pero frecuentemente han sido cuestionadas debido a la tasa de falsos negativos que a veces han producido por una errónea o insuficiente elección de microsatélites elegidos para el estudio. En 1998, el “National Cancer Institute” promovió la búsqueda de un método de consenso <sup>112</sup> determinando un panel de microsatélites como el idóneo para este tipo de análisis. Estas directrices además, han demostrado ser un procedimiento coste-efectivo para el diagnóstico de HNPCC <sup>220</sup>.

En cuanto al estudio molecular del CCR mediante análisis de microsatélites son muchos los estudios realizados, centrandose todos ellos en el estudio de LOH mediante el uso de amplios paneles de microsatélites, distintos a los de Bethesda. Hay estudios donde se utiliza el análisis de microsatelites situados en el brazo corto del cromosoma 3 en ADN plasmático de pacientes con CCR como herramienta diagnóstica, encontrandose en los mismos altos porcentajes de LOH <sup>172</sup>. De igual forma se propuso usar la existencia de LOH evaluada en muestras de sangre como factor pronóstico, asociándose un alto grado de ésta a una mayor probabilidad de recurrencia de la enfermedad <sup>173</sup>.

Otros estudios han intentado implicar el análisis de microsatélites en la clasificación histológica de los distintos subtipos de CCR, la cual se realiza fundamentalmente en base a criterios de arquitectura celular. Así se vio que, mediante



análisis de microsatélites, pacientes con CCR de tipo papilar con un alto porcentaje de cambios de tipo de células claras, presentaban alteraciones genéticas similares a los CCR de células claras puros, proponiéndose por tanto incluir a estos casos de entrada como CCR de células claras<sup>174</sup>.

En nuestros pacientes el estudio de los microsatélites en muestras tumorales de CCR realizado con la finalidad de evaluar el grado de inestabilidad genómica no encontró fenómenos de MSI en ninguno de los microsatélites del panel de Bethesda<sup>112</sup>, ni tampoco en los genes *TGFβrII* y *BAX*, descartándose este tipo de inestabilidad en casos de CCR esporádico. Sin embargo fue bastante frecuente la presencia de LOH, sobre todo en el microsatélite D3S1611 que se detectó en el 34,9% de los casos informativos (15/43), seguido del microsatélite D2S123 en un 7,5% (4/53) y del D17S250 con un 5,6% (4/72). En el microsatélite D5S346 no se detectó LOH en ninguno de los casos. Este resultado nos indica que la inestabilidad cromosómica afectando a grandes fragmentos de material genético es el principal tipo de alteración genómica que caracteriza a este tipo tumoral, y que en CCR se pierden determinadas regiones con una frecuencia mayor que otras. La existencia de LOH no se correlacionó con el grado celular ni con el estadio tumoral, ni tampoco detectamos LOH en ninguno de los portadores de mutaciones en los genes MMR.

En un estudio sobre 33 tumores renales y usando una batería de 74 microsatélites formados por repeticiones CA, se encontró que un 21% presentaban inestabilidad en al menos uno de los microsatélites. Los autores propusieron que esta inestabilidad ocurriese de forma espontánea y no fuera consecuencia de alteraciones en los genes reparadores<sup>171</sup>. Sin embargo hay estudios donde describen altos porcentajes de MSI en tumores renales, llegando hasta en un 46%.<sup>221</sup>. En cuanto a la existencia de LOH, algunos trabajos han evidenciado elevados niveles de LOH en casos de CCR no

papilar afectando los cromosomas 3p, 6q, 8p, 9pq y 14q, mientras que en los CCR papilares la LOH apareció fundamentalmente en 6pq, 9p, 11q, 14q y 21q, aunque sin demostrarse relación entre el grado celular, estadio de infiltración y LOH <sup>171</sup>.

La caracterización genética de los tumores podría tener gran importancia clínica, permitiendo poder dar pronósticos acertados así como la administración de tratamientos más personalizados. Desde el punto de vista clínico los tumores aneuploides tienen peor pronóstico que los diploides, y el grado de agresividad corresponde con el grado de aneuploidía <sup>222,223</sup>. De la misma forma parece haber una relación entre el grado de ploidía y la resistencia al tratamiento <sup>224</sup>, y aunque el grado de aneuploidía no se usa como marcador pronóstico, parece tener más valor predictivo que otras herramientas usadas comúnmente <sup>225</sup>. Por otro lado enfermos de HNPCC con MSI presentan un mejor pronóstico por la escasa capacidad de metastatizar de estos tumores <sup>226,227</sup>. En cualquier caso las investigaciones apuntan a que terapias enfocadas al control de los mecanismos que originan y promueven la inestabilidad cromosómica tendrán un importante papel en los próximos años <sup>30</sup>.

## 5.5 COMENTARIOS FINALES

El presente trabajo constituye un intento de caracterizar las bases moleculares que rigen el proceso de génesis tumoral en tejido renal. Es sabido que el gen *VHL* constituye un gen clave en el desarrollo de esta enfermedad y que, probablemente, su alteración sea un evento temprano en el desarrollo de la misma. Sin embargo, una sola mutación no es suficiente para generar un tumor y se intuye que puede haber otros genes supresores en el brazo corto del cromosoma 3 implicados en el desarrollo del cáncer renal<sup>228</sup>. Llegados a este punto surge el problema de intentar explicar cuál puede ser el origen de las numerosas alteraciones genéticas que se detectan en un tumor. Estas alteraciones son numerosas tanto en cantidad como en diversidad y pueden ser muchos los mecanismos implicados. Estos mecanismos afectan a la estabilidad genética, tanto a nivel de secuencia, como a la forma de expresión de los genes debido a modificaciones epigenéticas. En síntesis podríamos decir que son complejos los mecanismos genéticos de esta enfermedad y que es muy difícil conseguir caracterizar un tumor a todos los niveles.

Con objeto de dar un pequeño paso en la tarea de desenmarañar los fenómenos implicados en la génesis del cáncer renal nos hemos centrado en el estudio de uno de los mecanismos conocidos capaces de originar inestabilidad genómica y, consecuentemente, cáncer. Este mecanismo es el que implica a los genes MMR y que, como ya se ha comentado con anterioridad, ha sido ampliamente estudiados en otros tipos tumorales fundamentalmente en cáncer colorrectal. Sin embargo pocos trabajos se centran en cáncer renal, y los estudios realizados han sido sobre líneas celulares derivadas de este tipo tumoral. Los resultados de nuestro estudio indican que estos

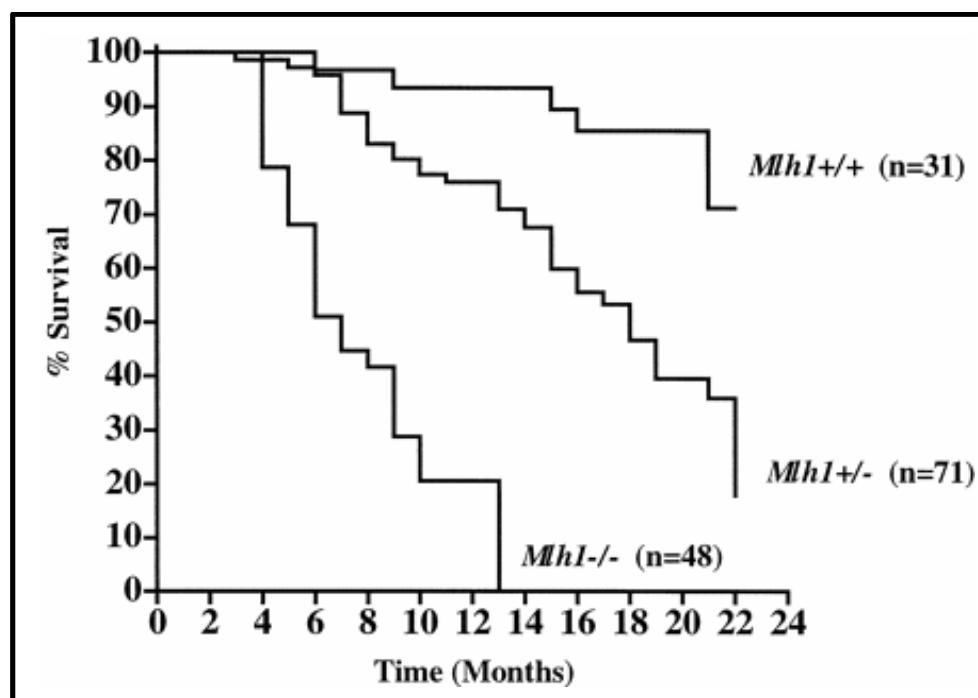
genes MMR no juegan un papel predominante en el desarrollo de los carcinomas de células renales esporádicos por la ausencia de MSI, inactivación por hipermetilación y el hallazgo de un escaso número de mutaciones de patogenicidad controvertida, siendo la principal característica genética en los tumores analizados la existencia LOH, que aparece hasta en un 35% de los casos para el microsatélite D3S1611.

Uno de las características de las escasas mutaciones que hemos encontrado es que éstas aparecieron todas en heterozigosis. Ello hace pensar que tendrán escaso poder patogénico, ya que tradicionalmente se ha asumido que sólo en el caso de que ambas copias de un gen MMR se encuentren mutadas aparecería el fenómeno de inestabilidad. Sin embargo, hay estudios donde se demuestra que ni es necesario que ambas copias estén inactivas para que haya inestabilidad, ni que la única función de estos genes sea la reparación del ADN <sup>229-233</sup>. En los siguientes apartados se comentará brevemente esta circunstancia, así como las nuevas funciones de los genes MMR y sus implicaciones en la terapia del cáncer.

### **5.5.1 Comentarios respecto a la haploinsuficiencia**

La haplosuficiencia es la capacidad que presenta un gen de mantener los niveles necesarios de la actividad proteica generada por él cuando uno de sus dos alelos esta mutado o ausente. A este respecto hay trabajos que demuestran que los genes MMR pueden ser hasta cierto punto haploinsuficientes, fenómeno que reforzaría la importancia de las mutaciones en heterocigosis halladas en el presente estudio. Parson demostró que individuos portadores de ciertas mutaciones germinales en los genes *hMLH1* y *hPMS2* en heterocigosis son capaces de mostrar inestabilidad en células fenotípicamente normales, las cuales todavía conservan una copia funcional del gen<sup>229</sup>. En estos casos el grado de inestabilidad es significativamente menor que cuando ambas

copias se encuentran inactivas, pero podemos deducir que en cierta medida hay haploinsuficiencia. Esta idea de que una reducción en los niveles de proteínas MMR puede provocar tumorigénesis se origina a partir de estudios con ratones *MSH2* +/-, en los cuales un alelo es normal y el otro es no funcional. En estos ratones aunque el desarrollo embrionario fue aparentemente normal y también su capacidad MMR medida en términos de MSI, se observó que eran propensos a sufrir cáncer, aun manteniendo una copia normal del gen *MSH2* <sup>230</sup>. Los mismos resultados se obtuvieron al estudiar la supervivencia de ratones con distintos genotipos de *MLH1* (normal: ++, mutante: --, heterocigoto: +/-) <sup>231</sup>. **(Figura 38)**. Estos resultados demuestran que individuos portadores de mutaciones inactivadoras en heterocigosis presentaban una esperanza de vida mas corta y una mayor propensión a sufrir cáncer que los normales, aunque la capacidad reparadora no se encontraba disminuida.



**Figura 38:** Supervivencia según distintos genotipos del gen *mlh1* en ratones se puede apreciar que ratones heterocigotos (*Mlh1*+/-) tienen una supervivencia menor que los normales, demostrando haploinsuficiencia para este gen (Tomada de Winfried Edelmann 1999) <sup>231</sup>

### 5.5.2 Comentarios respecto a nuevas funciones de los genes MMR

Respecto a la implicación de los genes MMR en funciones distintas de la reparación, se ha descrito una resistencia por parte de las células MMR- al tratamiento con agentes quimioterápicos que dañan el ADN. Estas células pueden ser hasta 100 veces más resistentes a ciertos tipos de quimioterápicos. Se ha establecido una cascada de señalización entre las proteínas MMR y P53 <sup>232</sup>, en la cual las proteínas MMR funcionarían como sensor de daño en el ADN. Esta información sería transmitida al gen *p53* y dependiendo del nivel de daño, la célula será retenida en el punto de control de ciclo celular (“*checkpoint*”) G2/M, para proceder a la reparación o bien seguirá la ruta de muerte celular programada (apoptosis).

La razón de que células MMR- sean resistentes a quimioterápicos se explica por la insensibilidad de éstas al daño genómico, saltándose los puntos de control del ciclo celular y por tanto no siendo capaces de entrar en la ruta de apoptosis. En cuanto al grado de haplosuficiencia para esta función sensora y moduladora del ciclo hay trabajos que demuestran que es necesaria la cantidad completa de proteína funcional de *hMLH1*, y que si bien con un 10% de proteína sería suficiente para mantener la capacidad reparadora, es necesario ambas copias del gen para que la célula sea capaz de activar el “*checkpoint*” de la transición G<sub>2</sub>/M del ciclo celular en respuesta a un daño genético <sup>233</sup>. Hallazgos similares se han encontrado con una línea celular *MSH2*-/- (con ambas copias inactivas), donde la capacidad de reparación se recuperó expresando niveles de tan solo un 10% de la concentración normal, pero la respuesta de estas células seguía siendo similar a las que no expresaban nada de proteína *MSH2* en cuanto a la respuesta a agentes metilantes de ADN <sup>234</sup>.

### 5.5.3 Relación entre defectos en los genes MMR y resistencia al tratamiento

Del estudio de la función de los genes MMR en la célula podemos sacar conclusiones a nivel clínico. Se ha descrito la resistencia de las líneas celulares MMR- a un gran número de drogas: 6-TG, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, metilnitrosourea, temozolomide, adriamicina, procarbacin, busulfan, VP-16, cisplatino, carboplatino, Benzo(a)pireno, 5-fluorouracilo y 5'-deoxi-5-fluorouridina, a todas las cuales células MMR+ son sensibles. Hay muchos estudios donde se demuestra que las células MMR- son resistentes a agentes metilantes del ADN gracias a que pueden saltarse el punto de control de G<sub>2</sub>/M<sup>235-237</sup>.

También se observó que líneas celulares MMR- eran resistentes al tratamiento con quimioterápicos que causaban roturas en una sola hebra del ADN, mientras que las líneas MMR+ que eran sensibles, quedaban retenidas en el “*checkpoint*” G<sub>2</sub>/M y morían por apoptosis<sup>238</sup>. Sin embargo cuando estas células eran irradiadas, lo cual produce roturas en ambas hebras, tanto líneas MMR+ como MMR- sufrían una parada similar en la transición G<sub>2</sub>/M. En otro estudio se demostró que líneas celulares con MSI obtenidas a partir de tumores eran hipersensibles a bleomicina, droga que es capaz de inducir roturas de doble cadena en el ADN<sup>239</sup>. Estos estudios indican que los diferentes tipos de daños son señalizados por vías diferentes, y que los genes MMR están implicados en roturas de una sola hebra mientras que son otras las proteínas responsables de la ruta de señalización de roturas de doble cadena, mostrando una vez más como del estudio genético y bioquímico de los tumores se pueden obtener datos aplicables a nivel clínico.

## **VI. CONCLUSIONES**



1.- Las mutaciones en los genes reparadores en pacientes con carcinoma de células renales esporádico, son un fenómeno poco común. La mayoría de cambios encontrados podrían catalogarse como polimorfismos, y tan sólo se han encontrado tres mutaciones con posible poder patogénico. En nuestro estudio describimos por primera vez la mutación P349A del gen *hMSH2*, la cual tiene altas probabilidades de resultar patogénica debido a la grave distorsión en la estructura proteica que provocan las sustituciones que implican al aminoácido prolina.

2.- No se ha demostrado por métodos enzimáticos la presencia de hipermetilación del promotor del gen *hMLH1* en pacientes con carcinoma renal esporádico, aunque ésta es la forma más común de inactivación de este gen en otros tipos tumorales.

3.- Al realizar el estudio de microsatélites, no se ha detectado inestabilidad en ninguno de ellos, poniendo de manifiesto que este fenómeno podría ser inexistente en cáncer renal esporádico. Sin embargo, la pérdida de heterocigosidad se reveló como la principal alteración genómica.

5- No se ha establecido relación entre las características clínicas de los pacientes y anatomopatológicas de los tumores con los resultados obtenidos de los distintos análisis genéticos.

## **VII. RESUMEN**

## INTRODUCCIÓN

El cáncer renal constituye el 3% de todos los tumores, de los cuales un 85% son carcinomas de células renales (CCR). En su etiología se han implicado diversos factores, aunque éstos no están del todo establecidos. Dentro de los factores genéticos, se han detectado como evento más frecuente pérdidas del brazo corto del cromosoma 3, así como mutaciones en el gen *VHL*. Aunque se sabe que cualquier tipo tumoral esta originado por defectos genéticos, los mecanismos moleculares que provocan que una célula acumule el gran número de mutaciones detectadas en un tumor no son bien conocidos.

Uno de los mecanismos causantes de inestabilidad génica mejor estudiado es el que implica a los genes reparadores MMR, y que causa el Síndrome de Lynch. Individuos afectados por este Síndrome presentan un riesgo elevado de sufrir varios tipos tumorales, entre los cuales el mas frecuente es el cáncer colorrectal hereditario no polipoideo(HNPCC). Los tumores con defectos en los genes MMR poseen una característica fenotípica molecular llamada “inestabilidad de microsatélites” (MSI), de forma que la presencia de MSI puede usarse como un indicador del estado funcional de la maquinaria reparadora.

Los genes reparadores han sido ampliamente estudiados en otros tipos tumorales, sin embargo estos genes apenas han sido estudiados en cáncer renal. Por este motivo nos planteamos un estudio completo de los genes *hMLH1* y *hMSH2* en realizado en pacientes por primera vez.

## OBJETIVOS

### 1) Principal:

Analizar las posibles implicaciones de los genes reparadores de ADN (MMR) *hMLH1* y *hMSH2* en el desarrollo del cáncer de células renales (CCR) esporádico. Para ello se estudiaron dichos genes mediante distintas aproximaciones genéticas:

- a. **Secuenciación:** En busca de posibles mutaciones inactivadoras en los genes *hMLH1* y *hMSH2*. Este estudio se complementa con estudios filogenéticos para valorar el grado de conservación de las mutaciones detectadas y de predicción de la estructura secundaria de la proteína.
- b. **Análisis de microsatélites:** que revelen la existencia de fenómenos de inestabilidad genómica en forma de inestabilidad de microsatélites (MSI) o pérdida de heterocigosidad (LOH).
- c. **Estudio de la hipermetilación del promotor del gen *hMLH1*:** fenómeno que puede inactivar la expresión génica, y que parece ser predominante en tumores esporádicos

### 2) Secundarios:

- a. Describir las características clínicas y anatomopatológicas de los pacientes.
- b. Valorar la posible relación entre los datos moleculares y los factores pronósticos conocidos en el carcinoma de células renales esporádico

## SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron muestras de tejido tumoral y renal sano, que se usó como control, en 89 pacientes intervenidos de CCR esporádico. Las muestras fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. También se estudiaron 95 muestras de sangre procedentes de individuos sin antecedentes oncológicos que consultaron por patología urológica benigna. Tras extracción de ADN, amplificación mediante PCR, se realizó un análisis mediante secuenciación de los 19 exones del gen *hMLH1* y los 16 exones del gen *hMSH2*, con objeto de determinar la posible presencia de mutaciones inactivadoras en dichos genes, la secuencias obtenidas se compararon con la presente en *GenBank*. Se determinó la existencia de inestabilidad de microsatélites (MSI), utilizando los microsatélites del panel de Bethesda, además de dos microsatélites exónicos de los genes *TGF $\beta$ II* y *BAX* que aparecen mutados en un alto porcentaje de los tumores con presencia de MSI (MSI+) y el microsat D3S1611, localizado próximo al gen *hMLH1* con objeto de estudiar la pérdida de heterocigosidad en esta región. Para finalizar se realizó un estudio de metilación del promotor del gen *hMLH1* mediante el uso de enzimas de restricción. Los resultados de los análisis se sometieron a análisis estadísticos con objeto de poder relacionarlos con las distintas características anatomopatológicas y clínicas de los tumores.

## RESULTADOS

La edad media de los pacientes con carcinoma de células renales en el momento de realización de la cirugía fue de 63,9 años. La muestra estaba formada por 59 hombres (66,3%) y 30 mujeres (33,7%). La variante histológica más frecuentemente hallada fue el carcinoma renal de células claras (CRCC), representando un 66,3% (59 casos) de los casos, seguido de CCR papilar en un 12,4% (11 casos). Como grupo control se incluyeron muestras de sangre de 95 sujetos diagnosticados de patologías urológicas benignas y que no diferían significativamente en cuanto a la edad media y porcentaje de sexos con los pacientes.

No detectamos MSI, ni tampoco fenómenos de hipermetilación del promotor del gen *hMLH1*. La pérdida de heterozigosidad (LOH) fue frecuente sobre todo a nivel del microsatélite D3S1611 que aconteció en el 34,9%. Detectamos mutaciones en 8 de los pacientes, las cuales ya estaban descritas en casos de cáncer colorrectal. Estas mutaciones son: K618A y V716M en el gen *hMLH1*; y I145V y G322D en el gen *hMSH2*. Se encontraron cambios G322D y K618A en sujetos controles sanos en una proporción superior al 1%, por lo que se podrían catalogar como polimorfismos. Además describimos por primera vez la mutación P349A en el gen *hMSH2*.

## CONCLUSIONES

Las mutaciones en los genes reparadores en pacientes con carcinoma de células renales esporádico, son un fenómeno poco común. La mayoría de cambios encontrados parecen tener naturaleza polimórfica, probablemente con escasa patogenicidad.

No se ha detectado por métodos enzimáticos la presencia de hipermetilación del promotor del gen *hMLH1*.

Al realizar el estudio de microsatélites, no se ha detectado inestabilidad en ninguno de ellos, poniendo de manifiesto que este fenómeno es raro en cáncer renal esporádico. Sin embargo, la pérdida de heterocigosidad se reveló como la principal alteración genómica.

No se ha encontrado relación entre los estudios genómicos y las características anatomopatológicas y clínicas de los tumores estudiados.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**



## Bibliografia

1. Peltomaki, P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum.Mol.Genet.*, 10: 735-740, 2001.
2. Watson, P. and Lynch, H. T. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer*, 71: 677-685, 1993.
3. Liu, B., Nicolaides, N. C., Markowitz, S., Willson, J. K., Parsons, R. E., Jen, J., Papadopoulos, N., Peltomaki, P., de la, C. A., Hamilton, S. R., and . Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat.Genet.*, 9: 48-55, 1995.
4. Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat.Med.*, 10: 789-799, 2004.
5. Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396: 643-649, 1998.
6. Jackson, A. L. and Loeb, L. A. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat.Res.*, 477: 7-21, 2001.
7. Loeb, K. R. and Loeb, L. A. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, 21: 379-385, 2000.
8. Kunkel, T. A. and Bebenek, K. DNA replication fidelity. *Annu.Rev.Biochem.*, 69: 497-529, 2000.
9. Knudson, A. G. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat.Rev.Cancer*, 1: 157-162, 2001.
10. Nowak, M. A., Komarova, N. L., Sengupta, A., Jallepalli, P. V., Shih, I., Vogelstein, B., and Lengauer, C. The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99: 16226-16231, 2002.
11. Renan, M. J. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol.Carcinog.*, 7: 139-146, 1993.
12. Orr-Weaver, T. L. and Weinberg, R. A. A checkpoint on the road to cancer. *Nature*, 392: 223-224, 1998.
13. Loeb, L. A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.*, 51: 3075-3079, 1991.
14. Jackson, A. L. and Loeb, L. A. The mutation rate and cancer. *Genetics*, 148: 1483-1490, 1998.
15. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194: 23-28, 1976.
16. Hellman, S. Darwin's clinical relevance. *Cancer*, 79: 2275-2281, 1997.

17. Cahill, D. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.*, 9: M57-M60, 1999.
18. Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., and Perucho, M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53: 549-554, 1988.
19. Seeger, R. C., Brodeur, G. M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S. E., Wong, K. Y., and Hammond, D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N.Engl.J.Med.*, 313: 1111-1116, 1985.
20. Nowell, P. C. Genetic alterations in leukemias and lymphomas: impressive progress and continuing complexity. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 94: 13-19, 1997.
21. Butel, J. S. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis*, 21: 405-426, 2000.
22. Knudson, A. G., Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 68: 820-823, 1971.
23. Hansen, M. F. and Cavenee, W. K. Genetics of cancer predisposition. *Cancer Res.*, 47: 5518-5527, 1987.
24. Balaban, G. B., Herlyn, M., Clark, W. H., Jr., and Nowell, P. C. Karyotypic evolution in human malignant melanoma. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 19: 113-122, 1986.
25. Fearon, E. R. and Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-767, 1990.
26. Shih, I. M., Zhou, W., Goodman, S. N., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.*, 61: 818-822, 2001.
27. Venkatesan, R. N., Bielas, J. H., and Loeb, L. A. Generation of mutator mutants during carcinogenesis. *DNA Repair (Amst)*, 5: 294-302, 2006.
28. Brosh, R. M., Jr. and Bohr, V. A. Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases. *Nucleic Acids Res.*, 35: 7527-7544, 2007.
29. Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, 386: 623-627, 1997.
30. Rajagopalan, H. and Lengauer, C. Aneuploidy and cancer. *Nature*, 432: 338-341, 2004.
31. Funk, J. O. Cancer cell cycle control. *Anticancer Res.*, 19: 4772-4780, 1999.
32. Hartwell, L. H. and Kastan, M. B. Cell cycle control and cancer. *Science*, 266: 1821-1828, 1994.

33. Nurse, P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*, 79: 547-550, 1994.
34. Paulovich, A. G., Toczyski, D. P., and Hartwell, L. H. When checkpoints fail. *Cell*, 88: 315-321, 1997.
35. Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*, 392: 300-303, 1998.
36. Li, Y. and Benezra, R. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science*, 274: 246-248, 1996.
37. Dai, W., Wang, Q., Liu, T., Swamy, M., Fang, Y., Xie, S., Mahmood, R., Yang, Y. M., Xu, M., and Rao, C. V. Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer Res.*, 64: 440-445, 2004.
38. Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W. L., Gray, J. W., Sahin, A., Brinkley, B. R., and Sen, S. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat.Genet.*, 20: 189-193, 1998.
39. Doxsey, S. The centrosome--a tiny organelle with big potential. *Nat.Genet.*, 20: 104-106, 1998.
40. Jallepalli, P. V. and Lengauer, C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat.Rev.Cancer*, 1: 109-117, 2001.
41. Zhou, B. B. and Elledge, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408: 433-439, 2000.
42. Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R. G., Bartek, J., and Lukas, J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410: 842-847, 2001.
43. Shiloh, Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 11: 71-77, 2001.
44. Schmitt, C. A. Cellular senescence and cancer treatment. *Biochim.Biophys.Acta*, 1775: 5-20, 2007.
45. Sturzeneker, R., Bevilacqua, R. A., Haddad, L. A., Simpson, A. J., and Pena, S. D. Microsatellite instability in tumors as a model to study the process of microsatellite mutations. *Hum.Mol.Genet.*, 9: 347-352, 2000.
46. Weber, J. L. and Wong, C. Mutation of human short tandem repeats. *Hum.Mol.Genet.*, 2: 1123-1128, 1993.
47. Sia, E. A., Jinks-Robertson, S., and Petes, T. D. Genetic control of microsatellite stability. *Mutat.Res.*, 383: 61-70, 1997.

48. Streisinger, G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J., Tsugita, A., Terzaghi, E., and Inouye, M. Frameshift mutations and the genetic code. This paper is dedicated to Professor Theodosius Dobzhansky on the occasion of his 66th birthday. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 31: 77-84, 1966.
49. Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., and Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 363: 558-561, 1993.
50. Aaltonen, L. A., Peltomaki, P., Leach, F. S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J. P., Jarvinen, H., Powell, S. M., Jen, J., Hamilton, S. R., and . Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, 260: 812-816, 1993.
51. Thibodeau, S. N., Bren, G., and Schaid, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, 260: 816-819, 1993.
52. Samowitz, W. S., Curtin, K., Neuhausen, S., Schaffer, D., and Slattery, M. L. Prognostic implications of BAX and TGFBRII mutations in colon cancers with microsatellite instability. *Genes Chromosomes.Cancer*, 35: 368-371, 2002.
53. Parsons, R., Myeroff, L. L., Liu, B., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 55: 5548-5550, 1995.
54. Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C., and Perucho, M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*, 275: 967-969, 1997.
55. Malkhosyan, S., Rampino, N., Yamamoto, H., and Perucho, M. Frameshift mutator mutations. *Nature*, 382: 499-500, 1996.
56. Bestor, T. H. and Ingram, V. M. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 80: 5559-5563, 1983.
57. Li, E., Bestor, T. H., and Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69: 915-926, 1992.
58. Li, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat.Rev.Genet.*, 3: 662-673, 2002.
59. Hermann, A., Gowher, H., and Jeltsch, A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol.Life Sci.*, 61: 2571-2587, 2004.
60. Turek-Plewa, J. and Jagodzinski, P. P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol.Biol.Lett.*, 10: 631-647, 2005.
61. Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W. W., Okumura, K., and Li, E. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*, 236: 87-95, 1999.

62. Robertson, K. D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F. A., and Jones, P. A. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.*, 27: 2291-2298, 1999.
63. Kelly, T. L. and Trasler, J. M. Reproductive epigenetics. *Clin.Genet.*, 65: 247-260, 2004.
64. Feinberg, A. P., Oshimura, M., and Barrett, J. C. Epigenetic mechanisms in human disease. *Cancer Res.*, 62: 6784-6787, 2002.
65. Hendrich, B. and Bird, A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol.Cell Biol.*, 18: 6538-6547, 1998.
66. Reik, W., Dean, W., and Walter, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293: 1089-1093, 2001.
67. Monk, M. Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Dev.Genet.*, 17: 188-197, 1995.
68. Mertineit, C., Yoder, J. A., Taketo, T., Laird, D. W., Trasler, J. M., and Bestor, T. H. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development*, 125: 889-897, 1998.
69. Razin, A. and Cedar, H. DNA methylation and gene expression. *Microbiol.Rev.*, 55: 451-458, 1991.
70. Yeivin, A. and Razin, A. Gene methylation patterns and expression. *EXS*, 64: 523-568, 1993.
71. Kass, S. U., Pruss, D., and Wolffe, A. P. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet.*, 13: 444-449, 1997.
72. Issa, J. P., Ottaviano, Y. L., Celano, P., Hamilton, S. R., Davidson, N. E., and Baylin, S. B. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat.Genet.*, 7: 536-540, 1994.
73. Jones, P. A. and Laird, P. W. Cancer epigenetics comes of age. *Nat.Genet.*, 21: 163-167, 1999.
74. Jenuwein, T. The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J.*, 273: 3121-3135, 2006.
75. Khorasanizadeh, S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, 116: 259-272, 2004.
76. Jenuwein, T. and Allis, C. D. Translating the histone code. *Science*, 293: 1074-1080, 2001.
77. Dutnall, R. N. and Denu, J. M. Methyl magic and HAT tricks. *Nat.Struct.Biol.*, 9: 888-891, 2002.
78. McManus, K. J. and Hendzel, M. J. The relationship between histone H3 phosphorylation and acetylation throughout the mammalian cell cycle. *Biochem.Cell Biol.*, 84: 640-657, 2006.

79. Dillon, N. and Festenstein, R. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet.*, *18*: 252-258, 2002.
80. Allfrey, V. G., FAULKNER, R., and Mirsky, A. E. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *51*: 786-794, 1964.
81. Kimura, A., Matsubara, K., and Horikoshi, M. A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes. *J.Biochem.(Tokyo)*, *138*: 647-662, 2005.
82. Verdone, L., Caserta, M., and Di Mauro, E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem.Cell Biol.*, *83*: 344-353, 2005.
83. de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A. B. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem.J.*, *370*: 737-749, 2003.
84. Agalioti, T., Chen, G., and Thanos, D. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*, *111*: 381-392, 2002.
85. Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P., and Zhang, Y. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, *439*: 811-816, 2006.
86. Kouzarides, T. Histone methylation in transcriptional control. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, *12*: 198-209, 2002.
87. Sims, R. J., III, Nishioka, K., and Reinberg, D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.*, *19*: 629-639, 2003.
88. Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Velazquez, A., and Perucho, M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *89*: 10065-10069, 1992.
89. Strand, M., Prolla, T. A., Liskay, R. M., and Petes, T. D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*, *365*: 274-276, 1993.
90. Yamasaki, H. and Mironov, N. Genomic instability in multistage carcinogenesis. *Toxicol.Lett.*, *112-113*: 251-256, 2000.
91. Aquilina, G. and Bignami, M. Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage. *J.Cell Physiol*, *187*: 145-154, 2001.
92. Peltomaki, P. and Vasen, H. F. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, *113*: 1146-1158, 1997.
93. Lynch, H. T. and de la, C. A. Hereditary colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.*, *348*: 919-932, 2003.
94. Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V., and Modrich, P. L. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem.Rev.*, *106*: 302-323, 2006.
95. Drummond, J. T., Li, G. M., Longley, M. J., and Modrich, P. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science*, *268*: 1909-1912, 1995.
96. Macpherson, P., Humbert, O., and Karran, P. Frameshift mismatch recognition by the human MutS alpha complex. *Mutat.Res.*, *408*: 55-66, 1998.
97. Kolodner, R. D. and Marsischky, G. T. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, *9*: 89-96, 1999.

98. Sia, E. A., Kokoska, R. J., Dominska, M., Greenwell, P., and Petes, T. D. Microsatellite instability in yeast: dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes. *Mol.Cell Biol.*, 17: 2851-2858, 1997.
99. Iaccarino, I., Marra, G., Palombo, F., and Jiricny, J. hMSH2 and hMSH6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutSalpha. *EMBO J.*, 17: 2677-2686, 1998.
100. Harfe, B. D., Minesinger, B. K., and Jinks-Robertson, S. Discrete in vivo roles for the MutL homologs Mlh2p and Mlh3p in the removal of frameshift intermediates in budding yeast. *Curr.Biol.*, 10: 145-148, 2000.
101. Peltomaki, P. Lynch syndrome genes. *Fam.Cancer*, 4: 227-232, 2005.
102. Cannavo, E., Marra, G., Sabates-Bellver, J., Menigatti, M., Lipkin, S. M., Fischer, F., Cejka, P., and Jiricny, J. Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. *Cancer Res.*, 65: 10759-10766, 2005.
103. Raschle, M., Marra, G., Nystrom-Lahti, M., Schar, P., and Jiricny, J. Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J.Biol.Chem.*, 274: 32368-32375, 1999.
104. Lynch, H. T., Shaw, M. W., Magnuson, C. W., Larsen, A. L., and Krush, A. J. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch.Intern.Med.*, 117: 206-212, 1966.
105. Lynch, H. T. and de la, C. A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J.Med.Genet.*, 36: 801-818, 1999.
106. Kuismanen, S. A., Holmberg, M. T., Salovaara, R., de la, C. A., and Peltomaki, P. Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am.J.Pathol.*, 156: 1773-1779, 2000.
107. Simpkins, S. B., Bocker, T., Swisher, E. M., Mutch, D. G., Gersell, D. J., Kovatich, A. J., Palazzo, J. P., Fishel, R., and Goodfellow, P. J. MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum.Mol.Genet.*, 8: 661-666, 1999.
108. Fleisher, A. S., Esteller, M., Wang, S., Tamura, G., Suzuki, H., Yin, J., Zou, T. T., Abraham, J. M., Kong, D., Smolinski, K. N., Shi, Y. Q., Rhyu, M. G., Powell, S. M., James, S. P., Wilson, K. T., Herman, J. G., and Meltzer, S. J. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.*, 59: 1090-1095, 1999.
109. Herman, J. G., Umar, A., Polyak, K., Graff, J. R., Ahuja, N., Issa, J. P., Markowitz, S., Willson, J. K., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W., Kane, M. F., Kolodner, R. D., Vogelstein, B., Kunkel, T. A., and Baylin, S. B. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95: 6870-6875, 1998.
110. Esteller, M., Levine, R., Baylin, S. B., Ellenson, L. H., and Herman, J. G. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene*, 17: 2413-2417, 1998.
111. Esteller, M., Catusus, L., Matias-Guiu, X., Mutter, G. L., Prat, J., Baylin, S. B., and Herman, J. G. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am.J.Pathol.*, 155: 1767-1772, 1999.
112. Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodriguez-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., and Srivastava, S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of

- international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58: 5248-5257, 1998.
113. Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P., Syngal, S., de la, C. A., Ruschoff, J., Fishel, R., Lindor, N. M., Burgart, L. J., Hamelin, R., Hamilton, S. R., Hiatt, R. A., Jass, J., Lindblom, A., Lynch, H. T., Peltomaki, P., Ramsey, S. D., Rodriguez-Bigas, M. A., Vasen, H. F., Hawk, E. T., Barrett, J. C., Freedman, A. N., and Srivastava, S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J.Natl.Cancer Inst.*, 96: 261-268, 2004.
114. Robles, J. E., Rosell, D., Zudaire, J. J., and Berian, J. M. [Epidemiology of tumors of the renal parenchyma]. *Rev.Med.Univ Navarra*, 43: 68-76, 1999.
115. Landis, S. H., Murray, T., Bolden, S., and Wingo, P. A. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J.Clin.*, 49: 8-31, 1, 1999.
116. McLaughlin, J. K. and Lipworth, L. Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Semin.Oncol.*, 27: 115-123, 2000.
117. McLaughlin, J. K., Lindblad, P., Mellemgaard, A., McCredie, M., Mandel, J. S., Schlehofer, B., Pommer, W., and Adami, H. O. International renal-cell cancer study. I. Tobacco use. *Int.J.Cancer*, 60: 194-198, 1995.
118. Herranz Amo F, Sáiz Carrero A, and Castaño González I "Historia natural del adenocarcinoma de riñón". In Herranz Amo F. (ed.), *Tumores de riñón.*, 1ª Edición ed, pp. 51-58. Barcelona: Doyma, 2001.
119. Tavani, A. and La Vecchia, C. Epidemiology of renal-cell carcinoma. *J.Nephrol.*, 10: 93-106, 1997.
120. Yuan, J. M., Castelao, J. E., Gago-Dominguez, M., Ross, R. K., and Yu, M. C. Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. *Br.J.Cancer*, 77: 1508-1513, 1998.
121. Wolk, A., Gridley, G., Niwa, S., Lindblad, P., McCredie, M., Mellemgaard, A., Mandel, J. S., Wahrendorf, J., McLaughlin, J. K., and Adami, H. O. International renal cell cancer study. VII. Role of diet. *Int.J.Cancer*, 65: 67-73, 1996.
122. Lindblad, P., Wolk, A., Bergstrom, R., and Adami, H. O. Diet and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 6: 215-223, 1997.
123. Long, J. P., Anglard, P., Gnarr, J. R., Walther, M. M., Merino, M. J., Liu, S., Lerman, M. I., Zbar, B., and Linehan, W. M. The use of molecular genetic analysis in the diagnosis of renal cell carcinoma. *World J.Urol*, 12: 69-73, 1994.
124. Willers, C. P., Siebert, R., Bardenheuer, W., Lux, A., Michaelis, S., Seeber, S., Luboldt, H. J., Opalka, B., and Schutte, J. Genetic instability of 3p12-p21-specific microsatellite sequences in renal cell carcinoma. *Br.J.Urol.*, 77: 524-529, 1996.
125. Persad, R. A., Probert, J. L., Sharma, S. D., Haq, A., and Doyle, P. T. Surgical management of the renal manifestations of von Hippel-Lindau disease: a review of a United Kingdom case series. *Br.J.Urol.*, 80: 392-396, 1997.
126. Kaelin, W. G., Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat.Rev.Cancer*, 2: 673-682, 2002.
127. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin, W. G., Jr. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science*, 292: 464-468, 2001.



128. Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G. W., Clifford, S. C., Maher, E. R., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Maxwell, P. H. Hypoxia inducible factor- $\alpha$  binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J.Biol.Chem.*, 275: 25733-25741, 2000.
129. Zhu, H. and Bunn, H. F. Signal transduction. How do cells sense oxygen? *Science*, 292: 449-451, 2001.
130. Harris, A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat.Rev.Cancer*, 2: 38-47, 2002.
131. Ohh, M., Yauch, R. L., Lonergan, K. M., Whaley, J. M., Stemmer-Rachamimov, A. O., Louis, D. N., Gavin, B. J., Kley, N., Kaelin, W. G., Jr., and Iliopoulos, O. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol.Cell*, 1: 959-968, 1998.
132. Kamada, M., Suzuki, K., Kato, Y., Okuda, H., and Shuin, T. von Hippel-Lindau protein promotes the assembly of actin and vinculin and inhibits cell motility. *Cancer Res.*, 61: 4184-4189, 2001.
133. Esteban, M. A., Tran, M. G., Harten, S. K., Hill, P., Castellanos, M. C., Chandra, A., Raval, R., O'brien, T. S., and Maxwell, P. H. Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Res.*, 66: 3567-3575, 2006.
134. Ohh, M. Ubiquitin pathway in VHL cancer syndrome. *Neoplasia.*, 8: 623-629, 2006.
135. Storkel, S., Eble, J. N., Adlakha, K., Amin, M., Blute, M. L., Bostwick, D. G., Darson, M., Delahunt, B., and Iczkowski, K. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 80: 987-989, 1997.
136. Thoenes, W., Storkel, S., and Rumpelt, H. J. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol.Res.Pract.*, 181: 125-143, 1986.
137. Kovacs, G. The value of molecular genetic analysis in the diagnosis and prognosis of renal cell tumours. *World J.Urol*, 12: 64-68, 1994.
138. Rodrigo, A. M., Paya, G. A., Millan Salvador, J. M., Hernandez, M. M., and Jimenez Cruz, J. F. [Genetic study of six chromophobic renal carcinomas]. *Actas Urol Esp*, 26: 204-208, 2002.
139. Reuter, V. E. and Presti, J. C., Jr. Contemporary approach to the classification of renal epithelial tumors. *Semin.Oncol.*, 27: 124-137, 2000.
140. Steiner, G. and Sidransky, D. Molecular differential diagnosis of renal carcinoma: from microscopes to microsatellites. *Am.J.Pathol.*, 149: 1791-1795, 1996.
141. Fuzesi, L., Cober, M., and Mittermayer, C. Collecting duct carcinoma: cytogenetic characterization. *Histopathology*, 21: 155-160, 1992.
142. Medeiros, L. J., Jones, E. C., Aizawa, S., Aldape, H. C., Cheville, J. C., Goldstein, N. S., Lubensky, I. A., Ro, J., Shanks, J., Pacelli, A., and Jung, S. H. Grading of renal cell carcinoma: Workgroup No. 2. Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 80: 990-991, 1997.
143. Robson, C. J., Churchill, B. M., and Anderson, W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J.Urol.*, 101: 297-301, 1969.

- 
144. Guinan, P., Sobin, L. H., Algaba, F., Badellino, F., Kameyama, S., MacLennan, G., and Novick, A. TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 80: 992-993, 1997.
  145. Rini, B. I. and Vogelzang, N. J. Prognostic factors in renal carcinoma. *Semin.Oncol.*, 27: 213-220, 2000.
  146. Lopez Luque, A. J., Anglada Curado, F. J., Carazo Carazo, J. L., Alvarez, K. J., Marquez, L. J., Leva, V. M., Regueiro Lopez, J. C., Prieto, C. R., and Requena Tapia, M. J. [Review of cut-off points between stages T1 and T2 in the 1997 TNM classification of renal carcinoma]. *Actas Urol.Esp.*, 27: 292-296, 2003.
  147. Sanchez, Z. D., Arocena Garcia-Tapia, J., Regajo Balboa, J. M., Fernandez Montero, J. M., Lopez, F. J., Rosell, C. D., Robles Garcia, J. E., Zudaire Bergera, J. J., and Berian Polo, J. M. [Prognosis factors in pT3 renal carcinoma]. *Actas Urol.Esp.*, 27: 26-32, 2003.
  148. Herranz, A. F., Jara, R. J., Lledo, G. E., Diez Cordero, J. M., Verdu, T. F., Gonzalez, C. F., Rodriguez, F. E., and Bueno, C. G. [Clinical study of incidentally diagnosed renal adenocarcinoma]. *Arch.Esp.Urol.*, 48: 991-998, 1995.
  149. Nissenkorn, I. and Bernheim, J. Multicentricity in renal cell carcinoma. *J.Urol.*, 153: 620-622, 1995.
  150. Golimbu, M., Joshi, P., Sperber, A., Tessler, A., Al Askari, S., and Morales, P. Renal cell carcinoma: survival and prognostic factors. *Urology*, 27: 291-301, 1986.
  151. Marshall, F. F., Stewart, A. K., and Menck, H. R. The National Cancer Data Base: report on kidney cancers. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer*, 80: 2167-2174, 1997.
  152. Gimenez Bachs, J. M., Salinas Sanchez, A. S., Hernandez, M., I, Ruiz, M. R., Lorenzo Romero, J. G., Segura, M. M., and Virseda Rodriguez, J. A. [Nephron-sparing surgical treatment in renal tumors]. *Rev.Clin.Esp.*, 204: 191-197, 2004.
  153. Bukowski, R. M. Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma: the role of interleukin-2. *Cancer*, 80: 1198-1220, 1997.
  154. Hanash, K. A., Aquilina, J. W., Barrett, D. M., Blute, M. L., Cockett, A. T., Corica, F. A., Hillman, G. G., Zbar, B., and Zhuang, Z. Clinical research priorities in renal cell carcinoma: renal cell carcinoma chemoprevention strategies including target populations, proposed agents, and clinical trial designs--Workgroup No. 6. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 80: 999-1001, 1997.
  155. Yang, J. C. Bevacizumab for patients with metastatic renal cancer: an update. *Clin.Cancer Res.*, 10: 6367S-6370S, 2004.
  156. Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Rixe, O., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Kim, S. T., Chen, I., Bycott, P. W., Baum, C. M., and Figlin, R. A. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N.Engl.J.Med.*, 356: 115-124, 2007.
  157. Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A. A., Rolland, F., Demkow, T., Hutson, T. E., Gore, M., Freeman, S., Schwartz, B., Shan, M., Simantov, R., and Bukowski, R. M. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N.Engl.J.Med.*, 356: 125-134, 2007.
-

158. Swanson, D. A., Rothenberg, H. J., Boynton, A. L., Consigliere, D., Halling, K. C., Oda, H., and Smith, D. Future prognostic factors for renal cell carcinoma: Workgroup No. 5. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 80: 997-998, 1997.
159. Frayling, I. M. Microsatellite instability. *Gut*, 45: 1-4, 1999.
160. Perucho, M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol.Chem.*, 377: 675-684, 1996.
161. Arzimanoglou, I. I., Gilbert, F., and Barber, H. R. Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer*, 82: 1808-1820, 1998.
162. Hartmann, A., Dietmaier, W., Hofstadter, F., Burgart, L. J., Cheville, J. C., and Blaszyk, H. Urothelial carcinoma of the upper urinary tract: inverted growth pattern is predictive of microsatellite instability. *Hum.Pathol.*, 34: 222-227, 2003.
163. Kassem, H. S., Varley, J. M., Hamam, S. M., and Margison, G. P. Immunohistochemical analysis of expression and allelotype of mismatch repair genes (hMLH1 and hMSH2) in bladder cancer. *Br.J.Cancer*, 84: 321-328, 2001.
164. Catto, J. W., Azzouzi, A. R., Amira, N., Rehman, I., Feeley, K. M., Cross, S. S., Fromont, G., Sibony, M., Hamdy, F. C., Cussenot, O., and Meuth, M. Distinct patterns of microsatellite instability are seen in tumours of the urinary tract. *Oncogene*, 22: 8699-8706, 2003.
165. Thykjaer, T., Christensen, M., Clark, A. B., Hansen, L. R., Kunkel, T. A., and Orntoft, T. F. Functional analysis of the mismatch repair system in bladder cancer. *Br.J.Cancer*, 85: 568-575, 2001.
166. Bonnal, C., Ravery, V., Toubanc, M., Bertrand, G., Boccon-Gibod, L., Henin, D., and Grandchamp, B. Absence of microsatellite instability in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*, 55: 287-291, 2000.
167. Amira, N., Rivet, J., Soliman, H., Cancel-Tassin, G., Le Duc, A., Janin, A., and Cussenot, O. Microsatellite instability in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *J.Urol.*, 170: 1151-1154, 2003.
168. Gimenez Bachs, J. M., Donate Moreno, M. J., Salinas Sanchez, A. S., Lorenzo Romero, J. G., Segura, M. M., Hernandez, M., I, Pastor, N. H., Martinez, C. B., Canamares, P. L., and Virseda Rodriguez, J. A. [Growing incidence in renal cell carcinoma]. *Actas Urol.Esp.*, 30: 295-300, 2006.
169. Gimenez-Bachs, J. M., Salinas-Sanchez, A. S., Sanchez-Sanchez, F., Lorenzo-Romero, J. G., Donate-Moreno, M. J., Pastor-Navarro, H., Garcia-Olmo, D. C., Escribano-Martinez, J., and Virseda-Rodriguez, J. A. Determination of vhl gene mutations in sporadic renal cell carcinoma. *Eur.Urol.*, 49: 1051-1057, 2006.
170. Gimenez-Bachs, J. M., Salinas-Sanchez, A. S., Sanchez-Sanchez, F., Lorenzo-Romero, J. G., Donate-Moreno, M. J., Pastor-Navarro, H., Carrion-Lopez, P., Escribano-Martinez, J., and Virseda-Rodriguez, J. A. VHL protein alterations in sporadic renal cell carcinoma. *Clin.Oncol.(R.Coll.Radiol.)*, 19: 784-789, 2007.
171. Thrash-Bingham, C. A., Salazar, H., Freed, J. J., Greenberg, R. E., and Tartof, K. D. Genomic alterations and instabilities in renal cell carcinomas and their relationship to tumor pathology. *Cancer Res.*, 55: 6189-6195, 1995.
172. Goessl, C., Heicappell, R., Munker, R., Anker, P., Stroun, M., Krause, H., Muller, M., and Miller, K. Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma. *Cancer Res.*, 58: 4728-4732, 1998.
173. Gonzalgo, M. L., Eisenberger, C. F., Lee, S. M., Trock, B. J., Marshall, F. F., Hortopan, S., Sidransky, D., and Schoenberg, M. P. Prognostic significance of

- preoperative molecular serum analysis in renal cancer. *Clin.Cancer Res.*, 8: 1878-1881, 2002.
174. Salama, M. E., Worsham, M. J., and DePeralta-Venturina, M. Malignant papillary renal tumors with extensive clear cell change: a molecular analysis by microsatellite analysis and fluorescence in situ hybridization. *Arch.Pathol.Lab Med.*, 127: 1176-1181, 2003.
175. Deguchi, M., Shiina, H., Igawa, M., Kaneuchi, M., Nakajima, K., and Dahiya, R. DNA mismatch repair genes in renal cell carcinoma. *J.Urol.*, 169: 2365-2371, 2003.
176. Leach, F. S., Koh, M., Sharma, K., McWilliams, G., Talifero-Smith, L., Codd, A., Olea, R., and Elbahloul, O. Mismatch repair gene mutations in renal cell carcinoma. *Cancer Biol.Ther.*, 1: 530-536, 2002.
177. Ducasse, M. and Brown, M. A. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol.Cancer*, 5: 60, 2006.
178. Esteller, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat.Rev.Genet.*, 8: 286-298, 2007.
179. Fuhrman, S. A., Lasky, L. C., and Limas, C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am.J.Surg.Pathol.*, 6: 655-663, 1982.
180. Umetani, N., Sasaki, S., Watanabe, T., Ishigami, H., Ueda, E., and Nagawa, H. Diagnostic primer sets for microsatellite instability optimized for a minimal amount of damaged DNA from colorectal tissue samples. *Ann.Surg.Oncol.*, 7: 276-280, 2000.
181. Trojan, J., Zeuzem, S., Randolph, A., Hemmerle, C., Brieger, A., Raedle, J., Plotz, G., Jiricny, J., and Marra, G. Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology*, 122: 211-219, 2002.
182. Kuismanen, S. A., Holmberg, M. T., Salovaara, R., Schweizer, P., Aaltonen, L. A., de la, C. A., Nystrom-Lahti, M., and Peltomaki, P. Epigenetic phenotypes distinguish microsatellite-stable and -unstable colorectal cancers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96: 12661-12666, 1999.
183. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, 24: 17-27, 1992.
184. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680, 1994.
185. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.*, 23: 2947-2948, 2007.
186. Golbano Ablanque J, C. A. G. O. T. I. S. P. A. : "Epidemiología, etiología, clínica e historia natural del carcinoma de células renales". In M. S. J. Resel Estévez L (ed.), *Oncología urológica*, 1ª Edición ed, pp. 311-322. Grupo Saned, 2003.
187. Tsui, K. H., Shvarts, O., Smith, R. B., Figlin, R., de Kernion, J. B., and Belldegrun, A. Renal cell carcinoma: prognostic significance of incidentally detected tumors. *J.Urol.*, 163: 426-430, 2000.

188. González-Peramato P, P. M. N. M. Anatomía Patológica de las neoplasias renales del adulto . In M. S. J. Resel Estévez L (ed.), Oncología urológica, 1ª Edición ed, pp. 357-375. Grupo Saned, 2003.
189. Goldstein, N. S. Grading of renal cell carcinoma. *Urol.Clin.North Am.*, 26: 637-42, vii, 1999.
190. Steiner, T., Knels, R., and Schubert, J. Prognostic significance of tumour size in patients after tumour nephrectomy for localised renal cell carcinoma. *Eur.Urol.*, 46: 327-330, 2004.
191. Shapiro, R., Braverman, B., Louis, J. B., and Servis, R. E. Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. *J.Biol.Chem.*, 248: 4060-4064, 1973.
192. Jin, H. Y., Liu, X., Li, V. K., Ding, Y., Yang, B., Geng, J., Lai, R., Ding, S., Ni, M., and Zhao, R. Detection of mismatch repair gene germline mutation carrier among Chinese population with colorectal cancer. *BMC.Cancer*, 8: 44, 2008.
193. Mitchell, R. J., Farrington, S. M., Dunlop, M. G., and Campbell, H. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE review. *Am.J.Epidemiol.*, 156: 885-902, 2002.
194. Raevaara, T. E., Korhonen, M. K., Lohi, H., Hampel, H., Lynch, E., Lonnqvist, K. E., Holinski-Feder, E., Sutter, C., McKinnon, W., Duraisamy, S., Gerdes, A. M., Peltomaki, P., Kohonen-Ccorish, M., Mangold, E., Macrae, F., Greenblatt, M., de la, C. A., and Nystrom, M. Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology*, 129: 537-549, 2005.
195. Caldes, T., Godino, J., de la, H. M., Garcia, C., I, Perez, S. P., Eng, C., Benito, M., and Diaz-Rubio, E. Prevalence of germline mutations of MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from Spain. *Int.J.Cancer*, 98: 774-779, 2002.
196. Belvederesi, L., Bianchi, F., Loretelli, C., Gagliardini, D., Galizia, E., Bracci, R., Rosati, S., Bearzi, I., Viel, A., Cellerino, R., and Porfiri, E. Assessing the pathogenicity of MLH1 missense mutations in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with clinical, genetic and functional features. *Eur.J.Hum.Genet.*, 14: 853-859, 2006.
197. Brieger, A., Trojan, J., Raedle, J., Plotz, G., and Zeuzem, S. Transient mismatch repair gene transfection for functional analysis of genetic hMLH1 and hMSH2 variants. *Gut*, 51: 677-684, 2002.
198. Liu, T., Stathopoulos, P., Lindblom, P., Rubio, C., Wasteson, A. B., Iselius, L., Holmberg, E., Gronberg, H., and Lindblom, A. MSH2 codon 322 Gly to Asp seems not to confer an increased risk for colorectal cancer susceptibility. *Eur.J.Cancer*, 34: 1981, 1998.
199. Pinol, V., Castells, A., Andreu, M., Castellvi-Bel, S., Alenda, C., Llor, X., Xicola, R. M., Rodriguez-Moranta, F., Paya, A., Jover, R., and Bessa, X. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA*, 293: 1986-1994, 2005.
200. Barnetson, R. A., Cartwright, N., van Vliet, A., Haq, N., Drew, K., Farrington, S., Williams, N., Warner, J., Campbell, H., Porteous, M. E., and Dunlop, M. G. Classification of ambiguous mutations in DNA mismatch repair genes identified in a population-based study of colorectal cancer. *Hum.Mutat.*, 29: 367-374, 2008.

201. Bagnoli, S., Putignano, A. L., Melean, G., Baglioni, S., Sestini, R., Milla, M., d'Albasio, G., Genuardi, M., Pacini, F., Trallori, G., and Papi, L. Susceptibility to refractory ulcerative colitis is associated with polymorphism in the hMLH1 mismatch repair gene. *Inflamm.Bowel.Dis.*, *10*: 705-708, 2004.
202. Greger, V., Passarge, E., Hopping, W., Messmer, E., and Horsthemke, B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum.Genet.*, *83*: 155-158, 1989.
203. Herman, J. G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M. I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D. S., Gnarr, J. R., Linehan, W. M., and . Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *91*: 9700-9704, 1994.
204. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, *21*: 5427-5440, 2002.
205. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, *301*: 89-92, 1983.
206. Cheah, M. S., Wallace, C. D., and Hoffman, R. M. Hypomethylation of DNA in human cancer cells: a site-specific change in the c-myc oncogene. *J.Natl.Cancer Inst.*, *73*: 1057-1065, 1984.
207. Bird, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, *321*: 209-213, 1986.
208. Baylin, S. B., Esteller, M., Rountree, M. R., Bachman, K. E., Schuebel, K., and Herman, J. G. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum.Mol.Genet.*, *10*: 687-692, 2001.
209. Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J. M., Bollen, M., Esteller, M., Di Croce, L., de Launoit, Y., and Fuks, F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, *439*: 871-874, 2006.
210. Schlesinger, Y., Straussman, R., Keshet, I., Farkash, S., Hecht, M., Zimmerman, J., Eden, E., Yakhini, Z., Ben Shushan, E., Reubinoff, B. E., Bergman, Y., Simon, I., and Cedar, H. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat.Genet.*, *39*: 232-236, 2007.
211. Costello, J. F., Fruhwald, M. C., Smiraglia, D. J., Rush, L. J., Robertson, G. P., Gao, X., Wright, F. A., Feramisco, J. D., Peltomaki, P., Lang, J. C., Schuller, D. E., Yu, L., Bloomfield, C. D., Caligiuri, M. A., Yates, A., Nishikawa, R., Su, H. H., Petrelli, N. J., Zhang, X., O'Dorisio, M. S., Held, W. A., Cavenee, W. K., and Plass, C. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat.Genet.*, *24*: 132-138, 2000.
212. Esteller, M., Fraga, M. F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A. K., Trojan, J., Vaurs-Barriere, C., Bignon, Y. J., Ramus, S., Benitez, J., Caldes, T., Akiyama, Y., Yuasa, Y., Launonen, V., Canal, M. J., Rodriguez, R., Capella, G., Peinado, M. A., Borg, A., Aaltonen, L. A., Ponder, B. A., Baylin, S. B., and Herman, J. G. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum.Mol.Genet.*, *10*: 3001-3007, 2001.
213. Smiraglia, D. J., Rush, L. J., Fruhwald, M. C., Dai, Z., Held, W. A., Costello, J. F., Lang, J. C., Eng, C., Li, B., Wright, F. A., Caligiuri, M. A., and Plass, C. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum.Mol.Genet.*, *10*: 1413-1419, 2001.

- 
214. Paz, M. F., Fraga, M. F., Avila, S., Guo, M., Pollan, M., Herman, J. G., and Esteller, M. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res.*, *63*: 1114-1121, 2003.
215. Hoque, M. O., Begum, S., Topaloglu, O., Jeronimo, C., Mambo, E., Westra, W. H., Califano, J. A., and Sidransky, D. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer. *Cancer Res.*, *64*: 5511-5517, 2004.
216. Dulaimi, E., Ibanez, d. C., I, Uzzo, R. G., Al Saleem, T., Greenberg, R. E., Polascik, T. J., Babb, J. S., Grizzle, W. E., and Cairns, P. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin.Cancer Res.*, *10*: 3972-3979, 2004.
217. Nojima, D., Nakajima, K., Li, L. C., Franks, J., Ribeiro-Filho, L., Ishii, N., and Dahiya, R. CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma. *Mol.Carcinog.*, *32*: 19-27, 2001.
218. Chung, W. B., Hong, S. H., Kim, J. A., Sohn, Y. K., Kim, B. W., and Kim, J. W. Hypermethylation of tumor-related genes in genitourinary cancer cell lines. *J.Korean Med.Sci.*, *16*: 756-761, 2001.
219. Bastian, P. J., Yegnasubramanian, S., Palapattu, G. S., Rogers, C. G., Lin, X., De Marzo, A. M., and Nelson, W. G. Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation. *Eur.Urol.*, *46*: 698-708, 2004.
220. Ramsey, S. D., Clarke, L., Etzioni, R., Higashi, M., Berry, K., and Urban, N. Cost-effectiveness of microsatellite instability screening as a method for detecting hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann.Intern.Med.*, *135*: 577-588, 2001.
221. Yu, L., Tang, D., and Ding, Y. [Microsatellite instability in renal cell carcinoma and its mechanisms]. *Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi.*, *23*: 11-13, 2001.
222. Zhou, W., Goodman, S. N., Galizia, G., Lieto, E., Ferraraccio, F., Pignatelli, C., Purdie, C. A., Piris, J., Morris, R., Harrison, D. J., Paty, P. B., Culliford, A., Romans, K. E., Montgomery, E. A., Choti, M. A., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Counting alleles to predict recurrence of early-stage colorectal cancers. *Lancet*, *359*: 219-225, 2002.
223. Watanabe, T., Wu, T. T., Catalano, P. J., Ueki, T., Satriano, R., Haller, D. G., Benson, A. B., III, and Hamilton, S. R. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N.Engl.J.Med.*, *344*: 1196-1206, 2001.
224. Duesberg, P., Li, R., Sachs, R., Fabarius, A., Upender, M. B., and Hehlmann, R. Cancer drug resistance: the central role of the karyotype. *Drug Resist.Updat.*, *10*: 51-58, 2007.
225. Risques, R. A., Moreno, V., Ribas, M., Marcuello, E., Capella, G., and Peinado, M. A. Genetic pathways and genome-wide determinants of clinical outcome in colorectal cancer. *Cancer Res.*, *63*: 7206-7214, 2003.
226. Gryfe, R., Kim, H., Hsieh, E. T., Aronson, M. D., Holowaty, E. J., Bull, S. B., Redston, M., and Gallinger, S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.*, *342*: 69-77, 2000.
227. Sankila, R., Aaltonen, L. A., Jarvinen, H. J., and Mecklin, J. P. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology*, *110*: 682-687, 1996.
228. Martinez, A., Fullwood, P., Kondo, K., Kishida, T., Yao, M., Maher, E. R., and Latif, F. Role of chromosome 3p12-p21 tumour suppressor genes in clear cell
-

- renal cell carcinoma: analysis of VHL dependent and VHL independent pathways of tumorigenesis. *Mol.Pathol.*, 53: 137-144, 2000.
229. Parsons, R., Li, G. M., Longley, M., Modrich, P., Liu, B., Berk, T., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. *Science*, 268: 738-740, 1995.
230. de Wind, N., Dekker, M., van Rossum, A., van, d., V, and te, R. H. Mouse models for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58: 248-255, 1998.
231. Edelmann, W., Yang, K., Kuraguchi, M., Heyer, J., Lia, M., Kneitz, B., Fan, K., Brown, A. M., Lipkin, M., and Kucherlapati, R. Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice. *Cancer Res.*, 59: 1301-1307, 1999.
232. Hirose, Y., Katayama, M., Stokoe, D., Haas-Kogan, D. A., Berger, M. S., and Pieper, R. O. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway links the DNA mismatch repair system to the G2 checkpoint and to resistance to chemotherapeutic DNA-methylating agents. *Mol.Cell Biol.*, 23: 8306-8315, 2003.
233. Cejka, P., Stojic, L., Mojas, N., Russell, A. M., Heinimann, K., Cannavo, E., di Pietro, M., Marra, G., and Jiricny, J. Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *EMBO J.*, 22: 2245-2254, 2003.
234. Claij, N. and te, R. H. Methylation tolerance in mismatch repair proficient cells with low MSH2 protein level. *Oncogene*, 21: 2873-2879, 2002.
235. Branch, P., Aquilina, G., Bignami, M., and Karran, P. Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. *Nature*, 362: 652-654, 1993.
236. Branch, P., Hampson, R., and Karran, P. DNA mismatch binding defects, DNA damage tolerance, and mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 55: 2304-2309, 1995.
237. Hawn, M. T., Umar, A., Carethers, J. M., Marra, G., Kunkel, T. A., Boland, C. R., and Koi, M. Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res.*, 55: 3721-3725, 1995.
238. Yan, T., Berry, S. E., Desai, A. B., and Kinsella, T. J. DNA mismatch repair (MMR) mediates 6-thioguanine genotoxicity by introducing single-strand breaks to signal a G2-M arrest in MMR-proficient RKO cells. *Clin.Cancer Res.*, 9: 2327-2334, 2003.
239. Li, H. R., Shagisultanova, E. I., Yamashita, K., Piao, Z., Perucho, M., and Malkhosyan, S. R. Hypersensitivity of tumor cell lines with microsatellite instability to DNA double strand break producing chemotherapeutic agent bleomycin. *Cancer Res.*, 64: 4760-4767, 2004.



## **IX. ANEXO**

## **COMUNICACIONES A CONGRESOS**

### **XXII REUNIÓN NACIONAL DEL GRUPO DE UROLOGÍA ONCOLÓGICA DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE UROLOGÍA.: VILA-REAL (CASTELLÓN), 8-9 DE ABRIL DE 2005**

- Estudio del estado de metilación del promotor de *hMLH1* en carcinoma renal esporádico. Rubio del Campo A, Salinas Sánchez AS, Giménez Bachs JM, Donate Moreno MJ, Pastor Navarro H, Sánchez Sánchez F, García Olmo DC, Escribano Martínez J.

### **XXII REUNIÓN NACIONAL DEL GRUPO DE UROLOGÍA ONCOLÓGICA DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE UROLOGÍA.: GRANADA, 21-22 DE ABRIL DE 2006**

- Análisis mutacional de los genes reparadores *hMLH1* y *hMSH2* en carcinoma de células renales esporádico. Rubio del Campo A, Salinas Sánchez AS, Sánchez Sánchez F, Giménez Bachs JM, Donate Moreno MJ, Pastor Navarro H, García Olmo DC, Escribano Martínez J.

### **LXX CONGRESO NACIONAL DE UROLOGÍA. SEVILLA 10-13 JUNIO 2006**

- Mutaciones en los genes reparadores *hMLH1* y *hMSH2* en pacientes con carcinoma de células renales esporádico. Salinas Sánchez AS, Rubio del campo A; Sánchez Sánchez F, Giménez Bachs JM, Donate Moreno MJ, Pastor Navarro H, Lorenzo Romero JG, Segura Martín M, García Olmo DC, Escribano Martínez J.

- Papel de la inactivación por hipermetilación del promotor del gen reparador hMLH1 en el carcinoma de células renales esporádico. Salinas Sánchez AS, Rubio del Campo A, Sánchez Sánchez F, Giménez Bachs JM, Donate Moreno MJ, Pastor Navarro H, García Olmo DC, Escribano Martínez J.

**XXIV REUNIÓN NACIONAL DEL GRUPO DE UROLOGÍA ONCOLÓGICA DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE UROLOGÍA.: PALMA DE MALLORCA 20 Y 21 DE ABRIL DE 2007**

- Inestabilidad de microsatélites y pérdida de heterozigosidad en el carcinoma renal esporádicos. Rubio del Campo A, Salinas Sánchez AS, Sánchez Sánchez F, Carrión López P, Donate Moreno MJ, Giménez Bachs JM, Pastor Navarro H, García Olmo DC, Escribano Martínez J.

**LXXI CONGRESO NACIONAL DE UROLOGÍA. LA CORUÑA, 9-12 JUNIO 2007**

- Papel de los genes reparadores de ADN en el carcinoma renal esporádico. Salinas Sánchez AS Rubio del Campo A, Sánchez Sánchez F, Donate Moreno MJ, Giménez Bachs JM, Pastor Navarro H, Carrión López P, García Olmo DC, Escribano Martínez J.

**5º INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON URO-ONCOLOGY. 1º INTERNATIONAL CONGRESS ON URO-ONCOLOGY. 7º UROLOGICAL CONGRESS OF URUGUAY. XXVI RIOPLATENSE MEETING OF UROLOGY. MONTEVIDEO (URUGUAY), 24-27 DE NOVIEMBRE DE 2006**

Implicaciones de los genes reparadores hMLH1 y hMSH2 en el carcinoma de células renales esporádico. Salinas Sánchez AS, Rubio del Campo A, Sánchez Sánchez F, Donate Moreno MJ, Giménez Bachs JM, Pastor Navarro JM, Carrión López P, García Olmo DC, Escribano Martínez J

## **PREMIOS DE INVESTIGACIÓN RECIBIDOS**

**TERCER PREMIO “JULIÁN GUTIÉRREZ DE TOLEDO” A LA MEJOR COMUNICACIÓN ORAL PRESENTADA EN EL LXXI CONGRESO NACIONAL DE UROLOGÍA TITULADA “PAPEL DE LA INACTIVACIÓN POR HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN REPARADOR *hMLH1* EN PACIENTES CON CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES ESPORÁDICO”. Sevilla año 2006**

**PREMIO AL MEJOR TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PUBLICADO EN REVISTAS CIENTÍFICAS DEL ÁMBITO DE LA MEDICINA POR EL ARTÍCULO: “HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN REPARADOR *hMLH1* EN LA PATOGENIA DEL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES ESPORADICO”. XV EDICIÓN DE LOS PREMIOS DE INVESTIGACIÓN DE COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE ALBACETE 2007**

## **PUBLICACIONES**

# Implications of mismatch repair genes *hMLH1* and *hMSH2* in patients with sporadic renal cell carcinoma

Antonio Rubio-Del-Campo, Antonio S. Salinas-Sánchez\*, Francisco Sánchez-Sánchez†, José M. Giménez-Bachs\*, María J. Donate-Moreno\*, Héctor Pastor-Navarro\*, Pedro Carrión-López\* and Julio Escribano†

Research Department and \*Urology Department, Hospital and University Complex, and †Genetics Area, School of Medicine, University of Castilla-La Mancha, Albacete, Spain

Accepted for publication 19 December 2007

## OBJECTIVES

To analyse the implications of DNA mismatch repair genes *hMLH1* and *hMSH2* in sporadic renal cell carcinoma (RCC).

## MATERIALS AND METHODS

Specimens of tumour and healthy renal tissue were collected from 89 patients treated for sporadic RCC. Another 95 blood samples taken from individuals with no history of cancer were also analysed. After DNA extraction and PCR amplification, microsatellite instability (MSI) was determined using the Bethesda microsatellite panel, two exonic microsatellites of the *TGFβRII* and *BAX* genes, and the microsatellite D3S1611. The promoter methylation status of *hMLH1* was investigated using the *HpaII* and

*MspI* restriction enzymes. In addition, a sequencing analysis of complete coding region of *hMLH1* and *hMSH2* genes was performed.

## RESULTS

MSI and promoter hypermethylation of *hMLH1* were not detected. Interestingly, loss of heterozygosity (LOH) was common among patients with RCC, particularly in microsatellite D3S1611 (34.9%). Mutations were identified in eight patients: K618A and V716M in gene *hMLH1*; and I145V, G322D, and the novel mutation P349A, in gene *hMSH2*. The mutations also appeared in healthy renal tissue and therefore, were considered as germline DNA sequence variations. There were G322D and K618A changes in >1% of the healthy control

subjects, suggesting that they are DNA polymorphisms.

## CONCLUSIONS

Our data show that loss of function of both *hMLH1* and *hMSH2* is not involved in sporadic RCC, either by promoter methylation or mutation in their exons. However, LOH indicated that chromosomal instability affecting large fragments of DNA was the main genetic alteration we detected associated with RCC.

## KEYWORDS

RCC, DNA mismatch repair genes, microsatellite instability, loss of heterozygosity, DNA methylation

## INTRODUCTION

RCC accounts for 3% of all malignant neoplasms in adults. Most cases are sporadic, but ~4% of patients have the hereditary form of the disease, with von Hippel-Lindau (VHL) disease the most common cause of familial RCC.

The most frequent genetic alterations implicated in RCC are located at the short arm of chromosome 3 (3p) [1,2], with 90% in the 3p12–3p25 region [3]. The *VHL* suppressor gene (3p25–26) is mutated in 75–80% of patients with RCC associated with VHL disease [4] and can also be mutated in cases of sporadic RCC.

A cell becomes cancerous by accumulating mutations in the key genes of cell cycle control. For this to occur there must be an

increase in the rate of genomic instability. One of the phenomena that causes this instability is inactivation of the DNA mismatch repair (MMR) genes, mainly the *hMLH1* and *hMSH2* genes [5]. These abnormalities lead to Type I Lynch syndrome or hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) [6,7].

Proteins encoded by the MMR genes are responsible for correcting errors made by DNA polymerase during DNA replication [8]. These errors are more common in certain repetitive regions of the genome, called microsatellites and therefore, MMR gene dysfunction leads to an abnormality in these sequences known as microsatellite instability (MSI) [9]. Genes with a microsatellite in the exon sequence include the *TGFβRII* proto-oncogene, and the *BAX* gene, implicated in apoptosis. Both are altered in 90% and 50%, respectively, of colorectal tumours with MSI [10].

Patients with Lynch syndrome also present a high risk of tumours at sites other than the colon, such as uterine, ovarian, stomach or urothelial cancers [11], comprising what has been called Type II Lynch syndrome.

In urological tumours, an association has been found between HNPCC and the development of transitional cell tumours [12]. This relationship is stronger in the case of urothelial tumours arising in the upper urinary tract [12–14]. It has been reported that the presence of MSI can have prognostic value in these tumours [13], and that low expression of proteins coded by the MMR genes is associated with higher stage and/or grade tumours [14].

Several reports have suggested that MMR gene alterations might be associated with the development of RCC [3,15,16]. However, to



date, these studies have been mainly based on microsatellite analysis, immunohistochemistry studies or quantitative reverse transcriptase-PCR in RCC cell lines, not on characterization of the gene mutations in patients with renal cancer, although a study on *hMLH1* inactivation by hypermethylation in patients with RCC has recently been published [17]. The possible prognostic implications of alterations in these genes among patients with RCC have also not been established.

The present study attempts to analyse the role of the *hMLH1* and *hMSH2* genes, and genomic instability in sporadic RCC. Thus, we performed microsatellite assays to assess the extent of instability, the possible epigenetic silencing of *hMLH1* promoter by hypermethylation, as well as the presence of inactivating mutations of the polypeptidic chain by sequencing the complete coding region of MMR studied genes.

## MATERIALS AND METHODS

We present a cross-sectional study of 89 consecutive patients diagnosed with RCC in our department and treated surgically. Blood samples were collected from 95 healthy individuals from the same geographical area who had no history of any type of tumour condition, which were used as controls.

The study was approved by the Ethics Committee of our hospital. Written consent was obtained from the subjects, and relevant data on family and personal oncological history were collected, along with histology and anatomical pathology data on the tumour.

Samples were obtained of tumour and healthy renal parenchyma, with the latter used as a control to distinguish germinal vs somatic mutations. Once collected, the samples were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the time of processing. The KIAamp DNA mini kit (Qiagen®, Valencia, CA, USA) was used to obtain and purify genomic DNA.

For microsatellite analysis, the five microsatellites of the Bethesda panel were used [18]. Additionally, primers were designed for the exonic microsatellites of the *TGF $\beta$ RII* and *BAX* genes. The D3S1611 microsatellite, located near to the *hMLH1* gene, was also analysed to detect loss of heterozygosity (LOH) in this region. PCR reactions were performed using primers marked with

different fluorochromes according to the microsatellite analysed.

Each PCR product was mixed with GS400HD molecular weight marker (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) and formamide (Sigma®, St Louis, MO, USA) and were exposed to capillary electrophoresis in an ABI PRISM 310 automatic sequencer and analysed with the Genescan software from Applied Biosystems.

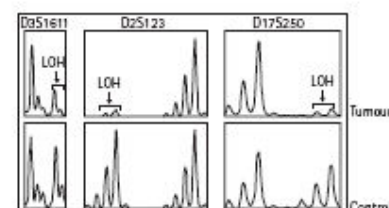
For methylation analysis, four methylation-prone sites of the *hMLH1* promoter were studied, located at nucleotide positions: -567, -527, -347, and -341 (GenBank accession no. U83845). We used the *HpaII* and *MspI* restriction enzymes, which recognize the same CCGG target; however, *HpaII* does not hydrolyse DNA when its target is methylated. DNA from peripheral venous blood of two healthy individuals was used as negative control of the promoter methylation state of the *hMLH1* gene. The positive controls included DNA treated with methylase *HpaII*, and DNA extracted from the human embryonic kidney tissue cell line HEK293T, characterized as having a methylation-inactivated *hMLH1* promoter.

For PCR amplification and sequencing, primers were designed to amplify the 19 exons of the *hMLH1* gene and the 16 exons of the *hMSH2* gene (PrimerExpress of Applied Biosystems®). The PCR products were purified using the PCR Cleanup Kit (Millipore®, Billerica, MA, USA). The sequencing reaction was done using the Seq BigDye V3.1 sequencing kit (Applied Biosystems), and purified with the Sequencing Reaction Cleanup Kit (Millipore). Analyses were performed with an ABI Prism 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems) and the following reference sequences were used: AH003234 (*hMLH1*) and AH003235 (*hMSH2*). When a sequence variation was found in the tumour tissue, its presence in DNA from healthy renal tissue was investigated to determine whether it was a germinal or somatic mutation.

The primers and amplification conditions for PCR reactions, methylation and sequencing reaction used in this study are available if they are required.

The statistical analysis consisted of a descriptive study of all variables, as well as a bivariate analysis by independence tests,

FIG. 1. Representative example of LOH found in tumour DNA samples from various patients heterozygous for this microsatellite.



linear trend, and Student's *t*-test, according to the type of variable being analysed. When the conditions for application were not met, the respective nonparametric tests were used.

To study the conservation of the changes identified, multiple sequence alignment using the CLUSTAL W (1.82) program for different species was carried out.

## RESULTS

The mean (SD) age of the patients with RCC was 68.9 (11.5) years, with men accounting for 66.3%. The mean age of the control group was 65.0 years (men, 78.6%). There were no differences in terms of age or sex between the patients with RCC and the control subjects.

The histological variant found most frequently was clear cell RCC, accounting for 66.3% of the cases. In all, 66.7% were Fuhrman grade 1–2, and 58.2% were TNM stage I. The anatomical pathology parameters of the tumours studied are shown in Table 1.

None of the study patients showed instability in any of the microsatellites of the Bethesda panel or in the *TGF $\beta$ RII* and *BAX* genes.

LOH could only be analysed in heterozygous individuals; hence the percentages of LOH for each of them were calculated for the total number of informative cases. The phenomenon of LOH was common, particularly in the D3S1611 microsatellite (15/43, 34.9%), D2S123 microsatellite (4/53, 7.5%), and D17S250 microsatellite (4/72, 5.6%) (Fig. 1). This indicates that chromosomal instability affecting large fragments of genetic material is the main type of instability characterizing this tumour type. LOH did not correlate with nuclear grade or tumour stage, nor was LOH detected in any

## DNA MISMATCH REPAIR GENES AND SPORADIC RCC

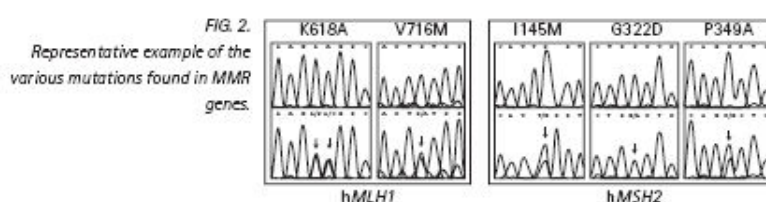
TABLE 1 Anatomical pathology characteristics of the study tumours

Variable	N (%)
Multiplicity	
No	87 (97.8)
Yes	2 (2.2)
Tumour size, cm	
<4	22 (24.7)
4–7	41 (46.1)
>7	26 (29.2)
Laterality	
Right	51 (57.3)
Left	37 (41.6)
Bilateral	1 (1.1)
Location	
Mid-kidney	42 (47.2)
Upper pole	24 (27.0)
Lower pole	23 (25.8)
Fuhrman grade	
1	8 (9.0)
2	50 (56.2)
3	18 (20.2)
4	10 (11.2)
Not catalogued	1 (1.1)
Tumour histotype	
Clear cell	59 (66.3)
Papillary	11 (12.4)
Chromophobe	8 (9.0)
Oncocytoma	2 (2.2)
Sarcomatoid	5 (5.6)
Other	4 (4.5)
pT stage	
pT1a	20 (22.5)
pT1b	31 (34.8)
pT2	16 (18.0)
pT3a	12 (13.5)
pT3b	6 (6.7)
pT4	4 (4.5)
pN stage	
pNx	65 (73.0)
pN0	18 (20.2)
pN1	4 (4.5)
pN2	2 (2.2)
pM stage	
pMx	1 (1.1)
pM0	73 (82.0)
pM1	15 (16.9)
TNM stage	
I	47 (52.8)
II	15 (16.9)
III	12 (13.5)
IV	15 (16.9)

RCC type	N (%) <sup>a</sup> or n/N	D3S1611	D17S250	D2S123
Clear cell	13 (46.4)	1 (2.17)	2 (5.8)	
Papillary	1/5	1/10	0	
Chromophobe	0	2/5	2/4	
Sarcomatoid	1/2	0	0	

<sup>a</sup>The percentages were calculated for the total number of heterozygote samples of each tumour subtype (informative cases).

TABLE 2 Distribution of LOH according to microsatellite analysed and tumour histotype



carriers of MMR gene mutations. Table 2 shows the distribution of LOH according to the microsatellite analysed and tumour histotype.

In our samples, we did not obtain PCR amplification of digested DNAs with the *HpaII* enzyme, concluding that the *hMLH1* promoter was not methylated and therefore, that this regulation mechanism is not implicated in the pathogenesis of sporadic RCC.

Eight patients (9.0%) with RCC presented mutations in the MMR genes studied (Fig. 2). All were heterozygous, implicated an amino acid change, and were of germinal origin, since they were also detected in healthy renal tissue. Three patients (3.7%) presented mutations in the *hMLH1* gene, and five (5.6%) in the *hMSH2* gene. One patient presented two mutations in exon 6 of the *hMSH2* gene (G322D and P349A). Table 3 lists the clinical characteristics of these patients. Two patients presented the same mutation in the *hMLH1* gene (K618A), and four had the same mutation in the *hMSH2* gene (G322D). The mean age of the patients with RCC presenting mutations was 66.9 years, with no statistical differences compared with patients with no alterations in these genes. As the mutations K618A and G322D were detected in >1% of the patients, they could be nonpathogenic polymorphic DNA variants. To evaluate the association of these mutations with the disease, we analysed their presence in a control group composed of 95 subjects in which oncology disease was excluded.

The K618A mutation of the *hMLH1* gene appeared in three control individuals and the G322D mutation of the *hMSH2* gene in two, indicating they could be nonpathogenic variants. In addition, the K618A mutation was found in the *hMLH1* gene in one of our controls (Table 3). The mean age of the control subjects with the MMR gene changes studied was 59.3 years.

All the mutations detected in patients were in clear cell RCC. When the family and personal history of these patients was analysed, only two patients had a family history of tumour: a woman (patient N30, Table 3) with the K618A mutation in the *hMLH1* gene (her brother had a laryngeal neoplasm) and a man (patient N40, Table 3) with the G322D mutation in the *hMSH2* gene (his sister presented a history of surgery for an unspecified benign intestinal mass). These two patients also had a personal history of another type of neoplasm: the first patient developed ductal carcinoma of the breast and endometrial tumour; and the second, a history of a monoclonal IgG gammopathy of lambda light-chain type.

A silent mutation was detected in the *hMLH1* gene (A125A), and another in the *hMSH2* gene (L496L). Various exonic and intronic polymorphisms with the allele frequencies listed in Table 4 were also detected. There were no differences in terms of sex, age, and tumour stage for any of the polymorphisms found.

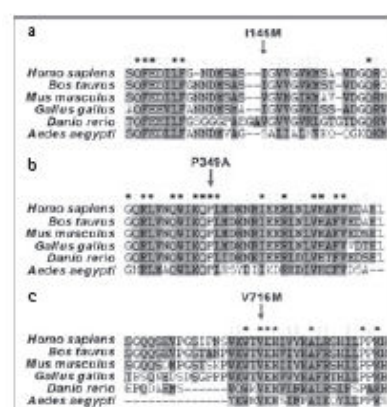


TABLE 3 Changes found in the hMLH1 and hMSH2 genes, location, and clinical and anatomical pathology characteristics

Gene	Patient/subject	Mutation (DNA/protein)	Exon	Age, years	Sex M/F	pTNM	TNM stage	LOH	History
Patients with sporadic RCC									
hMLH1	N30	c.1912-13 (AA > GC) (K618A)	16	75	F	pT1a, pN0, pM0	I	No	PH, FH*
	N49	c.1912-13 (AA > GC) (K618A)	16	73	F	pT4, pN1, pMx	IV	No	
	N81	c.2206 (G > A) (V716M)	19	60	M	pT1b, pN0, pM0	I	No	
hMSH2	N33	c.1033 (G > A) (G322D)	6	74	M	pT2, pNx, pM0	II	No	
	N40	c.1033 (G > A) (G322D)	6	75	M	pT1b, pN0, pM0	I	No	PH, FH*
	N71	c.503 (T > G) (I145M)	3	52	M	pT1b, pNx, pM0	I	No	
	N63	c.1033 (G > A) (G322D)	6	63	M	pT1b, pN0, pM0	I	No	
	N97	c.1113 (C > G) (P349A)	6	63	M	pT1b, pNx, pM0	I	No	
Control group subjects									
hMLH1	C72	c.1913 (A > G) (K618R)	16	60	M				
	C79	c.1912-1913 (AA > GC) (K618A)	16	66	M				
	C95	c.1912-1913 (AA > GC) (K618A)	16	47	M				
	C96	c.1912-1913 (AA > GC) (K618A)	16	58	M				
hMSH2	C31	c.1033 (G > A) (G322D)	6	67	M				
	C97	c.1033 (G > A) (G322D)	6	58	M				

\*PH, personal history of cancer; FH, family history of cancer.

FIG. 3. Alignment of the protein sequences of various species using the Clustal X 1.81 computer program for the following mutations: (a) I145V of hMSH2 (b) V716M, and (c) p349A.



To evaluate the predicted functional importance of amino acid changes, we performed a sequence alignment, which assessed the degree of conservation of an amino acid among various species. This analysis showed that P349 and V716 amino acid are evolutionary conserved. Consequently, it is deduced that these are important amino acids for both the structure and function of the protein (Fig. 3). We also performed the same study for the I145 position in the hMSH2 gene, which is less

Gene	Location	Position	Genotype frequency	TABLE 4 Genotype location and frequencies of polymorphisms in the hMLH1 and hMSH2 genes
hMLH1	Exon 8	g.18589 (I219V)	AG = 0.41 AA = 0.37 GG = 0.22	
	Intron 14	g.48761	AG = 0.44 GG = 0.30 AA = 0.26	
	Intron 1	g.288	CC = 0.54 CG = 0.28 GG = 0.18	
	Intron 6	g.26808	TT = 0.93 TC = 0.06 CC = 0.01	
hMSH2	Intron 9	g.63525	AA = 0.76 AT = 0.22 TT = 0.02	
	Intron 10	g.63697	GA = 0.48 GG = 0.43 AA = 0.09	
	Intron 12	g.73237	TT = 0.74 TC = 0.22 CC = 0.03	

conserved, indicating that it is less critical for the function of the protein (Fig. 3).

## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study that directly and jointly analyses the existence of

MMR gene alterations in tumour specimens from patients with sporadic RCC. We evaluated the association of both hMLH1 and hMSH2 genes in this type of cancer using three approaches: study of MSI, analysis of the hypermethylation status of hMLH1 promoter (inactivation of hMSH2 by hypermethylation has not been described),

and DNA sequencing of the complete coding region of the two genes to detect possible mutations that could influence the activity of the proteins.

Attempts have been made to include MSI in the histological classification of RCC and to evaluate the clinical value of microsatellite analysis in plasma DNA of patients with RCC but with inconclusive results, although a poorer prognosis has been suggested with the presence of MSI/LOH in blood samples [19]. We did not detect MSI in the present patients, but we did find a high percentage of LOH, which leads to the conclusion that there is no instability affecting small fragments of the genome (microsatellites), but there is some at the level of large fragments (chromosomes). Other studies found numerous variations in levels of LOH in nonpapillary RCC affecting chromosomes 3p, 6q, 8p, 9p and 14q, whereas in papillary RCC, LOH appeared mainly in 6p, 9p, 11q, 14q, and 21q [20].

There were no cases of *hMLH1* epigenetic inactivation by hypermethylation of its promoter. Although 12% hypermethylation of *hMLH1* has recently been reported in patients with RCC [17], both in tumour tissue and healthy renal tissue adjacent to the tumour (using a methodology and methylation-prone sites of the *hMLH1* promoter other than that used in the present study), this type of inactivation seems unlikely in RCC, although it is common in other sporadic tumour types. This type of inactivation has, however, been found in other genes in patients with RCC [21].

Previous studies on RCC cell lines have shown mutations in the *hMLH1* and *hMSH2* genes but none in other MMR genes [15,22]. Among patients enrolled in the present study, only eight presented mutations in the coding regions of these genes. Two of these mutations, K618A and G322D, affected six patients with RCC, but also appeared in healthy controls at a frequency of >1%, indicating that these could be polymorphic variants. However, we cannot exclude that they may cause a certain predisposition to the development of a neoplastic condition. The frequency of mutations detected in the present patients is consistent with published data, based on RCC cell lines and in one case, also in the respective tumour tissue [23]. All of this would indicate that mutations in these genes are a rare event in the development of RCC.

All the mutations were found in healthy renal tissue, indicating that they are germinal mutations and therefore hereditary. Interestingly, none of the carriers (either patients or controls) had a family or personal history of HNPCC, despite the fact that they exceeded the mean age of HNPCC onset. This would support the hypothesis that these are either nonpathogenic or low-penetrance mutations.

The K618A and V716M mutations of the *hMLH1* gene, and the G322D mutation of the *hMSH2* gene have been described in families with HNPCC [24]. However, the pathogenicity of these mutations is controversial. Functional studies in yeasts have concluded that the K618A and V716M mutations produce a loss of repair capacity, whereas other studies in cell lines show that this protein function is not diminished [25]. In humans, there are also discrepancies regarding the correlation between these mutations and the presence of MSI [25,26].

The G322D mutation of the *hMSH2* gene has been described as pathogenic [27] or as a polymorphic variant [28], as in the present patients. The I145M mutation has been previously associated with an MSI phenotype, although the carriers did not meet the Amsterdam or Bethesda criteria [29].

To our knowledge, the P349A mutation of *hMSH2* has been described here for the first time. This mutation causes a severe structural change in the protein, as the amino acid proline highly affects the secondary structure of the polypeptide chain. Another change in this amino acid (P349L) has been related with Lynch syndrome [30]. In addition, comparing the protein sequences showed that proline is highly conserved in position 349, indicating that it has an important functional role. The evolutionary conservation of I145 of *hMSH2* is lower than that P349 and V716, possibly indicating that a change in this amino acid position 145 is not as critical as the other two locations.

In conclusion, our results show that, when using various techniques for molecular analysis in patients with RCC, the loss of function of MMR genes does not play an important role in the genesis of this type of tumour. We did not detect MSI caused by either promoter hypermethylation or alteration of the coding region of MMR studied genes. Some of the changes found

(K618A in the *hMLH1* gene and G322D of the *hMSH2* gene) also appeared in samples from healthy individuals and therefore, could be nonpathogenic variants. However, LOH was high in some of the microsatellites analysed, showing that chromosomal instability was the main genetic alteration found in the present patients with sporadic RCC.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by a grant from the Ministry of Health of the *Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha* (04072-00) and *BANCAJA* Foundation.

#### CONFLICT OF INTEREST

None declared.

#### REFERENCES

- 1 Long JP, Anglard P, Gnarr JR *et al*. The use of molecular genetic analysis in the diagnosis of renal cell carcinoma. *World J Urol* 1994; 12: 69-73
- 2 Alimov A, Kost-Alimova M, Liu J *et al*. Combined LOH/CGH analysis proves the existence of interstitial 3p deletions in renal cell carcinoma. *Oncogene* 2000; 19: 1392-9
- 3 Willers CP, Siebert R, Bardenheuer W *et al*. Genetic instability of 3p12-p21-specific microsatellite sequences in renal cell carcinoma. *Br J Urol* 1996; 77: 524-9
- 4 Linehan WM, Lerman MI, Zbar B. Identification of the von Hippel-Lindau (VHL) gene. Its role in renal cancer. *JAMA* 1995; 273: 564-70
- 5 Liu B, Parsons R, Papadopoulos N *et al*. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996; 2: 169-74
- 6 Frayling IM. Microsatellite instability. *Gut* 1999; 45: 1-4
- 7 Perucho M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem* 1996; 377: 675-84
- 8 Streisinger G, Okada Y, Emrich J *et al*. Frameshift mutations and the genetic code. This paper is dedicated to Professor Theodosius Dobzhansky on the occasion of his 66th birthday. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1966; 31: 77-84

- 9 Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-9
- 10 Samowitz WS, Curtin K, Neuhausen S, Schaffer D, Slattery ML. Prognostic implications of BAX and TGFBR1I mutations in colon cancers with microsatellite instability. *Genes Chromosom Cancer* 2002; 35: 368-71
- 11 Aamio M, Sankila R, Pukkala E *et al*. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999; 81: 214-8
- 12 Hartmann A, Cheville JC, Dietmaier W, Hofstadter F, Burgart LJ, Blaszyk H. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome in a patient with urothelial carcinoma of the upper urothelial tract. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: E60-3
- 13 Roupert M, Fromont G, Azzouzi AR *et al*. Microsatellite instability as predictor of survival in patients with invasive upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology* 2005; 65: 1233-7
- 14 Catto JW, Xinarianos G, Burton JL, Meuth M, Hamdy FC. Differential expression of hMLH1 and hMSH2 is related to bladder cancer grade, stage and prognosis but not microsatellite instability. *Int J Cancer* 2003; 105: 484-90
- 15 Chen HC, Bhattacharyya N, Wang L *et al*. Defective DNA repair genes in a primary culture of human renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 185-90
- 16 Deguchi M, Shiina H, Igawa M, Kaneuchi M, Nakajima K, Dahiya R. DNA mismatch repair genes in renal cell carcinoma. *J Urol* 2003; 169: 2365-71
- 17 Arai E, Kanai Y, Ushijima S, Fujimoto H, Mukai K, Hirohashi S. Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding nontumorous renal tissues. *Int J Cancer* 2006; 119: 288-96
- 18 Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR *et al*. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-57
- 19 Gonzalgo ML, Eisenberger CF, Lee SM *et al*. Prognostic significance of preoperative molecular serum analysis in renal cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1878-81
- 20 Thrash-Bingham CA, Salazar H, Freed JJ, Greenberg RE, Tartof KD. Genomic alterations and instabilities in renal cell carcinomas and their relationship to tumor pathology. *Cancer Res* 1995; 55: 6189-95
- 21 Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Uzzo RG *et al*. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3972-9
- 22 Leach F, Koh M, Sharma K *et al*. Mismatch repair gene mutations in renal cell carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2002; 1: 530-6
- 23 Shin KH, Ku JL, Kim WH *et al*. Establishment and characterization of seven human renal cell carcinoma cell lines. *BJU Int* 2000; 85: 130-8
- 24 Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, Campbell H. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 885-902
- 25 Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H *et al*. Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology* 2005; 129: 537-49
- 26 Caldes T, Godino J, de la Hoya M *et al*. Prevalence of germline mutations of MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from Spain. *Int J Cancer* 2002; 98: 774-9
- 27 Brieger A, Trojan J, Raedle J, Plotz G, Zeuzem S. Transient mismatch repair gene transfection for functional analysis of genetic hMLH1 and hMSH2 variants. *Gut* 2002; 51: 677-84
- 28 Liu T, Stathopoulos P, Lindblom P *et al*. MSH2 codon 322 Gly to Asp seems not to confer an increased risk for colorectal cancer susceptibility. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1981
- 29 Pinol V, Castells A, Andreu M *et al*. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* 2005; 293: 1986-94
- 30 Domingo E, Laiho P, Ollikainen M *et al*. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004; 41: 664-8

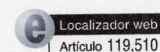
**Correspondence:** Antonio S. Salinas Sánchez, C/Hermanos Falco, 37, 02006 Albacete, Spain. e-mail: asalinas@pulso.com

**Abbreviations:** MSI, microsatellite instability; LOH, loss of heterozygosity; VHL, von Hippel-Lindau; MMR, DNA mismatch repair; HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer.



## ORIGINALES

# Hipermetilación del promotor del gen reparador *hMLH1* en la patogenia del carcinoma de células renales esporádico



Antonio S. Salinas-Sánchez<sup>a</sup>, Antonio Rubio-del-Campo<sup>b</sup>, Francisco Sánchez-Sánchez<sup>c</sup>, José M. Giménez-Bachs<sup>a</sup>, María J. Donate-Moreno<sup>a</sup>, Dolores C. García-Olmo<sup>b</sup> y Julio Escribano-Martínez<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Urología. Complejo Hospitalario y Universitario de Albacete. Albacete.

<sup>b</sup>Unidad de Investigación. Complejo Hospitalario y Universitario de Albacete. Albacete.

<sup>c</sup>Área de Genética. Facultad de Medicina/CRIB. Universidad de Castilla-La Mancha. Albacete. España.

**FUNDAMENTO Y OBJETIVO:** La metilación de los islotes CpG (secuencias del genoma ricas en guanina y citosina) presentes en las regiones promotoras constituye la forma de inactivación epigenética más común y es una alteración en el mecanismo de regulación de los genes que no requiere cambios en la secuencia del ADN. Se ha descrito hipermetilación del promotor del gen *hMLH1* en algunas líneas celulares procedentes de carcinoma de células renales (CCR). Nuestro objetivo ha sido determinar la existencia de hipermetilación en el promotor del gen *hMLH1* en muestras de ADN tumoral de pacientes con CCR esporádico.

**MATERIAL Y MÉTODO:** Se recogieron consecutivamente 65 muestras de tejido tumoral procedente de pacientes diagnosticados de CCR. Tras la obtención y purificación del ADN se procedió a su digestión con las enzimas de restricción *HpaII* y *MspI*, seguido de amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa de 3 regiones del promotor del gen *hMLH1*, electroforesis en gel de agarosa y análisis densitométrico de las bandas amplificadas.

**RESULTADOS:** La edad media de los pacientes fue de 63,7 años. El tipo celular más frecuente fue el carcinoma de células claras (67,7%). Un 73,9% de los tumores se diagnosticaron en estadios inferiores a pT2, un 9,3% tenían afectación ganglionar y un 20%, metástasis a distancia. No se detectó hipermetilación somática en la región promotora del gen *hMLH1* en ninguno de los pacientes estudiados.

**CONCLUSIONES:** La hipermetilación del promotor del gen *hMLH1* no parece intervenir en la patogenia del CCR esporádico, y es necesario analizar la existencia de otro tipo de mutaciones, inestabilidad de microsatélites y/o pérdida de heterocigosis para determinar el posible papel de este gen en la patogenia del CCR esporádico.

**Palabras clave:** Metilación. Carcinoma de células renales. *hMLH1*. Genes reparadores alterados.

Promoter hypermethylation status of the mismatch repair gene *hMLH1* in patients with sporadic renal cell carcinoma

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Epigenetic inactivation is a gene function abnormality that produces no changes in the DNA sequence, with the most frequent epigenetic alteration being hypermethylation of CpG islands in the promoter regions of the genes. Based on recent indications of a potential relationship between mismatch repair genes and renal cell carcinoma (RCC), we were interested in investigating the existence of promoter hypermethylation of the *hMLH1* gene in tumor DNA samples from patients with sporadic RCC.

**MATERIAL AND METHOD:** Sixty-five tumor tissue specimens were collected consecutively. The DNA was first obtained and purified, then digested with the restriction enzymes *HpaII* and *MspI*, followed by polymerase chain reaction amplification of 3 promoter regions of the *hMLH1* gene, agarose gel electrophoresis, and densitometric analysis of the images of the amplified bands.

**RESULTS:** Mean patient age was 63.7 years. The most frequent cell type was clear cell carcinoma (67.7%). 73.9% of tumors were diagnosed in stages below pT2, 9.3% had gland involvement and 20%, distant metastasis. No somatic hypermethylation was detected in the promoter region of the *hMLH1* gene in any of the patients studied.

**CONCLUSIONS:** Our data indicate that promoter hypermethylation of the *hMLH1* gene is not implicated in the pathogenesis of sporadic RCC, and therefore the existence of another type of mutation, microsatellite instability and/or loss of heterozygosity should be examined to determine the possible role of this gene in sporadic RCC.

**Key words:** Methylation. Renal cell carcinoma. *hMLH1* gene. Mismatch repair genes.

Trabajo financiado mediante una beca de la Consejería de Sanidad de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (expediente 04072-00).

Correspondencia: Dr. A.S. Salinas-Sánchez.  
Pablo Medina, 22, 2.º A. 02005 Albacete. España.  
Correo electrónico: asalinas@pulsos.com

Recibido el 20-6-2005; aceptado para su publicación el 4-10-2005.

452 Med Clin (Barc). 2006;126(12):452-4

La inactivación epigenética es un mecanismo de regulación de la expresión génica que no requiere cambios en la secuencia del ADN<sup>1</sup>. Su forma más frecuente es la hipermetilación de islotes CpG, esto es, secuencias del genoma ricas en guanina y citosina que se localizan principalmente en regiones promotoras y que se encargan del control de la actividad transcripcional de los genes. Su estado de metilación se ha implicado en la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores tumorales<sup>2</sup>.

Los genes supresores de tumores son buenos candidatos para inactivarse mediante este mecanismo<sup>3</sup>. Se ha demostrado que la inactivación por hipermetilación de algunos genes supresores en la línea germinal puede predisponer a casos hereditarios de cáncer<sup>4</sup>. Un ejemplo conocido de esta situación son las alteraciones de los genes reparadores MMR (*mismatch repair genes*), en concreto, del gen *hMLH1*. Este gen se ha estudiado ampliamente en los casos de cáncer de colon hereditario no polipoide<sup>5</sup>, en el que la hipermetilación representa la causa más frecuente de inactivación epigenética y guarda, además, una estrecha relación con la presencia de inestabilidad de microsatélites<sup>6</sup>. Este fenómeno también se ha comprobado en otros tipos de tumores<sup>6-8</sup> y, aunque se ha descrito, está por determinar su importancia en los casos de cáncer de colon esporádico<sup>9</sup>. La inactivación por hipermetilación del promotor del gen *hMLH1* también se ha implicado en la progresión tumoral y en la respuesta a quimioterápicos<sup>7</sup>.

El carcinoma de células renales (CCR) es un tumor heterogéneo desde el punto de vista histológico, genético y de comportamiento clínico. Sus alteraciones genéticas más frecuentes son las deleciones del brazo corto del cromosoma 3 (3p11-3p25), tanto en casos esporádicos como familiares<sup>10</sup>. En cuanto a los genes analizados en el CCR, el más estudiado ha sido el gen supresor *VHL*, en el que se detectan alteraciones en un 30-57% de los casos<sup>11,12</sup>. La relación entre los genes MMR y el CCR apenas se ha estudiado, a pesar de que existen indicios de que las alteracio-



SALINAS-SÁNCHEZ AS ET AL. HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN REPARADOR *hMLH1* EN LA PATOGENIA DEL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES ESPORÁDICO

nes en estos genes podrían desempeñar un papel importante en la carcinogénesis del CCR. En estos estudios se ha comprobado en líneas celulares de CCR una disminución de la expresión de ARNm tanto de *hMLH1* como *hMSH3*<sup>13</sup>, además de encontrarse fenómenos de hipermetilación en algunas de ellas<sup>14</sup>. Basándonos en estos datos nos planteamos determinar la existencia de alteraciones epigenéticas por hipermetilación en la región promotora del gen *hMLH1* en pacientes con CCR esporádico, así como sus posibles implicaciones pronósticas.

### Material y método

#### Muestras

Se han analizado muestras de tejido tumoral procedentes de 65 pacientes diagnosticados de forma consecutiva de CCR esporádico y tratados quirúrgicamente en el Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. El diagnóstico y la estadificación de los pacientes se realizaron según el protocolo establecido por la comunidad urológica, utilizándose la clasificación TNM para el estadio tumoral y la de Furman para el grado de diferenciación celular. Tras solicitar su consentimiento por escrito para participar en el estudio, se obtuvieron de las historias clínicas los datos correspondientes a edad, sexo, clínica de inicio y características patológicas.

Una vez recogidas, las muestras se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento. Para la obtención y purificación del ADN genómico tumoral se utilizó el equipo comercial KIAamp DNA mini kit (Qiagen®), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### Digestiones de ADN con enzimas de restricción

Se realizaron 2 digestiones independientes de cada una de las muestras de ADN empleando las enzimas de restricción *HpaII* y *MspI*. Ambas enzimas reconocen la secuencia CCGG, aunque *HpaII* no digiere la diana de restricción cuando la citosina presente en el dinucleótido CG está metilada. Las reacciones se realizaron durante 16 h a 37 °C en un volumen de 20 µl, y se emplearon en cada una de ellas 400 ng de ADN y 20 U de enzima. El producto de digestión se empleó como molde para llevar a cabo diferentes reacciones de amplificación—reacción en cadena de la polimerasa (PCR)—. Como control negativo del estado de metilación del promotor del gen *hMLH1* se utilizó ADN procedente de sangre venosa periférica de 2 individuos sanos, y como control positivo, el mismo ADN tratado con la metilasa *HpaII*. Como control positivo adicional se utilizó ADN de la línea celular 293T procedente de tejido renal humano, caracterizada por tener inactivado por metilación el promotor del gen *hMLH1*<sup>15</sup>.

#### Reacción en cadena de la polimerasa

En la región promotora del gen *hMLH1* existen 4 sitios CCGG, en las posiciones S1 (-567), S2 (-527), S3 (-347) y S4 (-341) (fig. 1). Los sitios S1 y S2 se amplificaron en reacciones independientes, mientras que los sitios S3 y S4 se amplificaron conjuntamente. Se realizaron 3 reacciones de amplificación de cada uno de estos sitios empleando ADN molde digerido independientemente con las enzimas de restricción *HpaII* y *MspI* y el mismo ADN molde sin digerir. El volumen total de cada reacción fue de 25 µl y contenía 100 ng de ADN, dNTPs (200 µmol), ADN *Taq* polimerasa (0,5 U) (Biotools®) y cebadores (400 nmol). La temperatura de hibridación fue de 58 °C en todos los casos y se emplearon 25 ciclos de amplificación<sup>16</sup>.

#### Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y se detectaron mediante bromuro de etidio. Las bandas obtenidas se fotografiaron con un sistema de fotodocumentación (GelDoc-it Imaging System UVP).

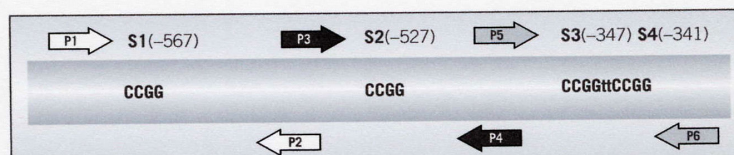


Fig. 1. Localización de los 4 sitios de metilación estudiados en el promotor del gen *hMLH1*. Las flechas del mismo color indican la localización de los cebadores empleados para amplificar cada uno de los fragmentos que contienen en su interior un sitio metilable, nombrados como S1, S2, S3 y S4. El número entre paréntesis indica la posición de cada sitio en el promotor.

#### Análisis densitométrico

Se usó el programa Quantity One 4,1 (Bio-rad) para cuantificar cada uno de los fragmentos amplificados por PCR. Se determinó el porcentaje del amplicón obtenido después de digerir el ADN tumoral con la enzima *HpaII*, respecto al mismo amplicón obtenido sin digestión previa del ADN (control positivo de la PCR).

### Resultados

La edad media de los pacientes analizados en el presente estudio fue de 63,7 años (intervalo de confianza del 95%, 61,2-66,3) y 43 (66,3%) eran varones. El hallazgo incidental al realizar estudios radiológicos abdominales fue la causa de diagnóstico más frecuente (56,9%). En los casos en que hubo clínica indicativa de tumor renal, la clínica más frecuente fue la hematuria (16,9%). En un solo caso el tumor fue bilateral y en 2 fue múltiple. Se realizaron nefrectomías radicales en 45 casos (69,2%) y en los 20 restantes se efectuó cirugía conservadora electiva de parénquima renal. En la tabla 1 se describen las características anatomopato-

tológicas de los pacientes. El tipo celular más frecuente fue el carcinoma de células claras, con 44 casos (67,7%). Un 73,9% de los casos se diagnosticaron en estadios inferiores a pT2; presentaban afectación ganglionar en el momento del diagnóstico 6 pacientes (9,3%), y metástasis a distancia, 13 (20%). El 61% tuvo un grado celular de Furman inferior a 2. El análisis de metilación del promotor del gen *hMLH1* (fig. 2A) mostró en todos los pacientes analizados un patrón de amplificación similar al obtenido con ADN de sangre de individuos sanos, empleado como control negativo de metilación (fig. 2B). Además, el patrón observado en las muestras de los pacientes fue distinto del obtenido con los controles positivos de metilación (ADN tratado con metilasa y ADN procedente de la línea celular 293T; figs. 2C y 2D, respectivamente). Estos resultados muestran que los sitios S1-S4 de la región promotora del gen *hMLH1* no están metilados en los pacientes analizados.

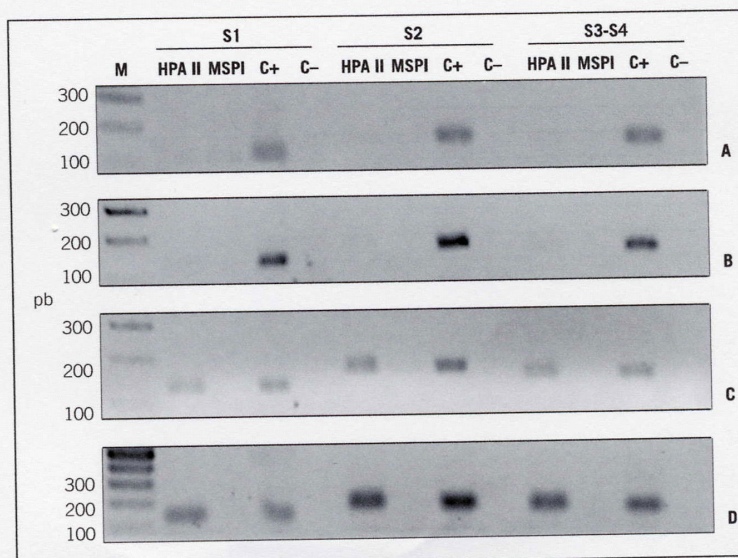


Fig. 2. Análisis del estado de metilación del promotor del gen *hMLH1*. Se indica en cada calle del gel la enzima con la que se digirió el ADN molde. El control positivo (C+) de la reacción en cadena de la polimerasa se realizó con ADN sin digerir, y el control negativo (C-) no incluyó ADN. Ejemplo representativo (A) obtenido a partir de uno de los tumores analizados en este estudio y control negativo de metilación (B), realizado con ADN genómico purificado a partir de sangre de individuos sanos. Como controles positivos de metilación se empleó ADN previamente metilado con la enzima *HpaII* metilasa (C) y ADN de la línea celular 293T, en la que el promotor del gen *hMLH1* se encuentra inactivado por metilación (D). M: marcador de tamaño molecular; pb: pares de bases.



SALINAS-SÁNCHEZ AS ET AL. HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN REPARADOR *hMLH1* EN LA PATOGENIA DEL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES ESPORÁDICO

TABLA 1

**Características anatomopatológicas de los pacientes analizados en el presente estudio**

	N	%
Tamaño tumoral (cm)		
< 4	17	26,2
4-7	27	41,5
> 7	21	32,3
Tipo celular		
Células claras	44	67,7
Papilar	8	12,3
Cromóforo	5	7,7
Oncocitoma	1	1,5
Sarcomatoide	5	7,7
Otros	2	3,1
Estadio pT		
pT1a	15	23,1
pT1b	20	30,8
pT2	13	20
pT3a	7	10,8
pT3b	6	9,2
pT4	4	6,2
Estadio pN		
pNx	46	70,8
pN0	13	20
pN1	4	6,2
pN2	2	3,1
Estadio pM		
pMx	1	1,5
pM0	51	78,5
pM1	13	20
Fuhrman		
I	6	9,2
II	33	50,8
III	15	23
IV	10	15,4
No catalogado	1	1,5
TNM		
I	32	49,2
II	12	18,5
III	8	12,3
IV	13	20

En 12 muestras (18,5%) se observaron productos de amplificación de intensidad débil después de la digestión con *HpaII*. Estos casos no presentaron ninguna característica anatomopatológica distinta del resto. Al realizar un análisis densitométrico de los amplicones, se comprobó que su intensidad respecto a la de su control positivo (ADN sin digerir) no alcanzó en ningún caso el 50%, porcentaje esperable en un estado de metilación monoalélica; la media se encontraba en el 12,8% (intervalo de confianza del 95%, 9,8-15,85; extremos: 5-22%). Hallazgos similares se registraron en los estudios que se realizaron con ADN genómico de sangre de individuos controles sanos (ADN no metilado), lo que indica la existencia de digestión incompleta con la enzima *HpaII*.

### Discusión

Estudios previos han mostrado que el CCR puede estar relacionado con la hipermetilación de una amplia variedad de genes, como, por ejemplo: *CDH1*, *APC*, *MGMT*, *RASSF1A*, *GSTP1*, *p16*, *RAR-beta2*, *ARF1*, *Timp-3*, *VHL*<sup>18</sup> y el gen de la E-caderina<sup>15</sup>. Estos trabajos han evidenciado la presen-

cia de hipermetilación en uno o más de estos genes en un 93% de los casos; el gen hipermetilado más frecuentemente es el *Timp-3* (58%). Incluso se ha comprobado que el tratamiento de algunas líneas celulares con 5-aza-2'-deoxicitidina (agente desmetilante) restauró la expresión del ARNm del gen E-caderina<sup>19</sup> y del gen *hMLH1*<sup>20</sup>. Por el contrario, otros estudios no han evidenciado diferencias en la expresión de *hMLH1* y *hMSH3* en líneas celulares de CCR tratadas con este agente<sup>13</sup>. En cuanto al gen *VHL*, la hipermetilación de su promotor únicamente aparece en el CCR de tipo células claras<sup>18</sup>. Hasta donde sabemos, el presente estudio analiza por primera vez la relación entre la hipermetilación del promotor del gen *hMLH1* y el CCR esporádico empleando muestras de tejido tumoral humano. Concretamente, centramos nuestro estudio en el gen *hMLH1*, ya que no se ha demostrado hipermetilación en el promotor de otros genes MMR como *hMSH2*<sup>20</sup>. Con una técnica basada en el uso de enzimas de restricción no hemos detectado metilación bialélica en el gen *hMLH1* en ninguna de las 65 muestras analizadas, lo que coincide con datos publicados en estudios previos con líneas celulares de CCR<sup>14</sup>. Aunque existen diferentes técnicas de análisis del estado de metilación (basadas, por ejemplo, en la modificación del ADN mediante tratamiento con bisulfito), requieren mayor cantidad de ADN y presentan mayor complejidad metodológica que la empleada en el presente estudio. Además, la técnica basada en digestiones enzimáticas es rápida, sencilla y fiable<sup>21</sup>. La presencia de un producto de amplificación minoritario en algunos de los ADN digeridos con *HpaII* puede deberse tanto a digestión parcial como a metilación monoalélica. El análisis llevado a cabo sobre ADN genómico purificado a partir de muestras de sangre de individuos sanos, en los que el promotor del gen *hMLH1* no está metilado, mostró también la existencia de una banda que representa aproximadamente el 10% de la obtenida cuando no se digiere el ADN previamente a la amplificación. Este resultado indica que la banda minoritaria es el resultado de una digestión incompleta del ADN por la enzima *HpaII*, ya que, si se tratara de metilación monoalélica, debería representar aproximadamente el 50% de la banda control. En conclusión, nuestros resultados indican que la metilación del promotor del gen *hMLH1* no está implicada en la patogenia del CCR esporádico. Por tanto, es necesario analizar la existencia de mutaciones en otros genes, la presencia de inestabilidad de microsatélites o de pérdida de heterocigosis para determinar si la alteración de los genes MMR desempeña algún papel en la patogenia del CCR.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Suter CM, Martin DIK, Ward RL. Germline epimutation of *hMLH1* in individuals with multiple cancers. *Nat Genet.* 2004;36:497-501.
2. Wong JHN. Methylation profiling of human cancers in blood: molecular monitoring and prognostication. *Int J Oncol.* 2001;19:1319-24.
3. Nakagawa H, Nuovo GJ, Zervos EE, Martin EW Jr, Salovaara R, Aaltonen LA, et al. Age-related hypermethylation of the 5' region of *MLH1* in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development. *Cancer Res.* 2001;61:6991-5.
4. Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, et al. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology.* 1996;111:307-17.
5. Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, De la Chapelle A, Peltomäki P. Genetic and epigenetic modification of *MLH1* accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am J Pathol.* 2000;56:1773-9.
6. Simpkins SB, Bocker T, Swisher EM, Mutch DG, Gersell DJ, Kovatich AJ, et al. *MLH1* promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum Mol Genet.* 1999;8:661-6.
7. Gifford G, Paul J, Vasey PA, Kaye SB, Brown R. The acquisition of methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patient. *Clin Cancer Res.* 2004;10:4420-6.
8. Ichikawa D, Koike H, Ikoma H, Tani D, Otsuji E, Kitamura K, et al. Detection of aberrant methylation as a tumor marker in serum of patients with gastric cancer. *Anticancer Res.* 2004;24:2477-81.
9. Kármory E, Kolacsek O, Ottó S, Csuka O. *hMLH1* and *hMSH2* somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res.* 2003;9:236-41.
10. Fleming S. Genetics of renal tumors. *Cancer Metast Rev.* 1997;16:127-40.
11. Giménez Bachs JM, Salinas Sánchez AS, Lorenzo Romero JG, Sánchez Sánchez F, Donate Moreno MJ, García Olmo DC, et al. Análisis mutacional del gen *VHL* en el carcinoma de células renales de aparición esporádica. *Arch Esp Urol.* 2004;57:671-7.
12. Kenck C, Wilhelm M, Bugert P, Staehler G, Kovacs G. Mutation of the *VHL* gene is associated exclusively with the development of non-papillary renal cell carcinomas. *J Pathol.* 1996;179:157-61.
13. Deguchi M, Shiina H, Igawa M, Kaneuchi M, Nakajima K, Dahiya R. DNA mismatch repair genes in renal cell carcinoma. *J Urol.* 2003;169:2365-71.
14. Chung WB, Hong SH, Kim JA, Sohn YK, Kim BW, Kim JW. Hypermethylation of tumor-related genes in genitourinary cancer cell lines. *J Korean Med Sci.* 2001;16:756-61.
15. Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, Hemmerle C, Brieger A, Raedle J, et al. Functional analysis of *hMLH1* variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology.* 2002;122:211-9.
16. Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, Schweizer P, Aaltonen LA, De la Chapelle A, et al. Epigenetic phenotypes distinguish microsatellite-stable and -unstable colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:12661-6.
17. Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Jeronimo C, Mambo E, Westra WH, et al. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2004;64:5511-7.
18. Dulaimi E, Ibáñez de Cáceres I, Uzzo RG, Al-Saleem T, Greenberg RE, Polascik TJ, et al. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:3972-9.
19. Nojima D, Nakajima K, Li LC, Franks J, Ribeiro Filho L, Ishii N, et al. CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma. *Mol Carcinog.* 2001;32:19-27.
20. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa J-P, et al. Incidence and functional consequences of *hMLH1* promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:6870-5.
21. Bastian PJ, Yegnasubramanian S, Palapattu GS, Rogers CG, Lin X, De Marzo AM, et al. Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation. *Eur Urol.* 2004;46:698-708.

